

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Direktor : Prof. Dr. P. Schölmerich

β -Glucuronidase
Optimierung der Aktivitätsbestimmung und Untersuchung zur
diagnostischen Bedeutung

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Hans-Joachim Rohde
aus Göttingen

Mainz 1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552610_0070

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Direktor: Prof. Dr. P. Schölmerich

β -Glucuronidase
Optimierung der Aktivitätsbestimmung und Untersuchung zur
diagnostischen Bedeutung

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Hans-Joachim Rohde
aus Göttingen

Mainz 1974

Fachbereichsdekan : Prof. Dr. med. J. Fischer

Referent : Prof. Dr. C.H. Hammar

Korreferent : Prof. Dr. K.-H. Bäßler



Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsübersicht

	Seite
1. Einleitung	6
1.1. Definition	6
1.2. Historisches	6
1.3. Verbreitung des Enzyms in der Natur	6
1.4. Funktion der β -Glucuronidase	6
1.4.1. Hydrolyse und Transfer	6
1.4.2. Einfluß der Sexualhormone	7
1.4.3. Mucopolysaccharidstoffwechsel	7
1.4.4. Zellproliferation, Gewebeinvolution und Zellnekrose	8
1.5. Spezielle Betrachtung der Serum- β -Glucuronidase	8
1.5.1. Normales Vorkommen im Serum	8
1.5.2. Pathologisch veränderte Aktivität der Serum- β -Glucuronidase	9
1.5.2.1. Diabetes mellitus	9
1.5.2.2. Leberkrankheiten	10
1.5.2.3. Herzkrankheiten	10
1.6. Spezielle Betrachtung der Urin- β -Glucuronidase	11
1.7. Spezielle Betrachtung der Speichel- β -Glucuronidase	11
1.8. Fragestellung	12
2. Material und Methode	13
2.1. Geräte	13
2.2. Chemikalien	13
2.3. Personenauswahl	13
2.4. Prinzip der Bestimmungsmethode	14
2.5. Statistische Auswertung	16
3. Ergebnisse	18
3.1. Übersicht über Aktivitätsbestimmung der β -Glucuronidase in Serum, Urin und Speichel	18
3.1.1. Auswahl des Formiatpuffers	18
3.1.2. Substratkonzentration	20
3.1.3. Zeitkinetik	22
3.1.4. Temperaturkinetik	22

3.2. Serum- β -Glucuronidase	23
3.2.1. Kontrollwert	23
3.2.2. Pathologische Befunde	25
3.2.2.1. Diabetes mellitus	25
3.2.2.2. Leberkrankheiten	28
3.2.2.3. Herzkrankheiten	29
3.3. Urin- β -Glucuronidase	30
3.3.1. Kontrollwert	30
3.3.2. Pathologische Befunde bei Diabetes mellitus	30
3.4. Speichel- β -Glucuronidase	30
3.4.1. Kontrollwert	30
3.4.2. Pathologische Befunde	30
4. Diskussion	33
4.1. Bestimmungsmethode der Serum- β -Glucuronidase	33
4.2. Serum- β -Glucuronidase	34
4.2.1. Kontrollwert	34
4.2.2. Pathologische Befunde	35
4.2.2.1. Diabetes mellitus	35
4.2.2.2. Leberkrankheiten	36
4.2.2.3. Herzkrankheiten	37
4.3. Urin- β -Glucuronidase	37
4.3.1. Kontrollwert	37
4.3.2. Pathologische Befunde bei Diabetes mellitus	37
4.4. Speichel- β -Glucuronidase	37
4.4.1. Kontrollwert	37
4.4.2. Pathologisches Auftreten	38
5. Zusammenfassung	39
6. Literatur	40

1. Einleitung

1.1. Definition

Die β -Glucuronidase (systematischer Name: β -D-Glucuronid-glucuronohydrolase EC 3.2.1.31) gehört zu den sauren Hydrolasen. Sie spaltet β -D-Glucuronide in das Aglucon und die Glucuronsäure. In der vorliegenden Arbeit ist das Aglucon das 4-Methyl-Umbelliferon (MU).

1.2. Historisches

Im Jahre 1902 veröffentlichten Neuberg und Neimann in einem Vortrag vor der 74. Versammlung der deutschen Naturforscher und Ärzte über die Synthese gepaarter Glucuronsäuren auch die Beobachtung, daß durch Kefirlaktase und Emulsin eine langsame Hydrolyse der Glucuronide stattfindet (58). Die Bestimmung der β -Glucuronidase mit Hilfe von Phenolphthalein als Substrat geht auf Talalay et al. (85) zurück; Fishman erkannte den Vorteil dieser Methode und verhalf ihr zu weltweiter Verbreitung und Anwendung. Die Methode von Mead, Smith und Williams (55) unterscheidet sich im wesentlichen von der voraus erwähnten Methode in der Wahl des Substrats: die Autoren verwenden 4-Methyl-umbelliferyl-glucuronid (MUGA).

1.3. Verbreitung des Enzyms in der Natur

Bei zahlreichen Tieren, Bakterien, Pilzen und Pflanzen ist die β -Glucuronidase-Aktivität nachgewiesen worden (49).

In Säugern ist dieses Enzym - von gewissen Organbezirken wie den Glomerula der Niere oder den Erythrocyten abgesehen - als ubiquitär zu betrachten (10). Durch hohen β -Glucuronidasegehalt zeichnen sich sehr stoffwechselaktive und sezernierende Organe aus (10,49,70,73).

Innerhalb der Zelle ist seit de Duve die β -Glucuronidase als ein vorwiegend lysosomales Enzym bekannt (16); außerdem läßt sich die β -Glucuronidase zu wechselnden Anteilen auch im endoplasmatischen Reticulum, Cytoplasma, sowie Zellkern und in Mitochondrien nachweisen (10).

1.4. Funktion der β -Glucuronidase

1.4.1. Hydrolyse und Transfer

Im einzelnen ist die Bedeutung der β -Glucuronidase im Stoffwechsel noch ungeklärt; zwar steht die Hydrolyse von β -D-Glucuroniden außer Zweifel, doch be-

stehen darüber hinaus nur in gewissen Detailbereichen klare Bilder über die Einreihung der β -Glucuronidase in einen umfassenden Zusammenhang des Gesamtstoffwechsels.

Neben die These von der Hydrolysefunktion ist die, wenn auch umstrittene Hypothese einer Transfer-Funktion gestellt worden (9,10,13,18,23,24). Die Arbeitsgruppe um Levvy (36-38,50,51) führt jedoch Argumente ins Feld, die eine Transferase-Leistung der β -Glucuronidase-Leistung in vivo auszuschließen scheinen.

1.4.2. Einfluß der Sexualhormone

Natürlich vorkommende (22,40-42) und synthetische Östrogene (19) stimulieren Organ- β -Glucuronidasen besonders im Uterus. Die zunächst descriptive Betrachtung der β -Glucuronidase unter Einfluß der Östrogene reihen sich aufgrund späterer Erkenntnisse in übergeordnete Zusammenhänge ein: der bei Schwangerschaft erhöhte Serum- β -Glucuronidase-Gehalt ist möglicherweise Ausdruck eines gesteigerten Bindegewebstoffwechsels (s. 1.4.3), der sich während des Uteruswachstums in der Schwangerschaft abspielt (68).

Testosteron regt die Nieren- β -Glucuronidase an (21,25,87 Zit. nach Fishman); ein noch unbekannter Übertrittsmechanismus führt zu einer Aktivitätssteigerung der Urin- β -Glucuronidase.

1.4.3. Mucopolysaccharidstoffwechsel

Aufschlüsse über die Funktion der β -Glucuronidase in Kooperation mit anderen lysosomalen Enzymen sind bei Erkrankungen mit verändertem Mucopolysaccharidstoffwechsel gewonnen worden (1,5,8, 17, 29,33,34,52,63-69,72-74). Der Abbau der Mucopolysaccharide läuft unter dem successiven Einwirken der Enzyme Hyaluronidase (EC 3.2.1.36), β -Glucuronidase und N-Acetylglucosaminidase (EC 3.2.1.30) ab, wobei zunächst Oligosaccharide entstehen, die das intrazelluläre Substrat für die β -Glucuronidase darstellen: an C_1 gebundene Glucuronsäure wird hydrolytisch abgetrennt. Das jetzt endständige β -N-Acetylglucosamin wird von der N-Acetylglucosaminidase abgespalten. Mucopolysaccharidstoffwechsel und β -Glucuronidase werden auch mit der Genese der Arteriosklerose und weiterhin mit dem bindegewebigen Umbau der Leberzirrhose in Verbindung gebracht (s. 1.5.2.1. und 1.5.2.2.).

1.4.4. Zellproliferation, Gewebeinvolution und Zellnekrose

Vielfach sind die Lysosomen als "suicide bags" gesehen worden: die nach Zellschaden labilisierte Lysosomenmembran entläßt die sauren Hydrolasen, die sich vorher im Latenzzustand befunden haben, ins Cytoplasma, wo sich jetzt die aggressiven Tendenzen dieser Enzyme bei der Zellaulyse entfalten.

Es ist verschiedentlich beobachtet worden, daß Gewebeneubildung mit erhöhter β -Glucuronidase einhergeht: Heilung nach akuter und chronischer Hepatitis (10,40,41,61) und heilende Hautverletzungen (83). Bösartiges Wachstum (10,20,24,48,53,70,81,88,90) ist ebenfalls von erhöhter Organ- β -Glucuronidase-Aktivität gekennzeichnet, ohne daß jedoch die Enzymaktivität zur Malignität in Beziehung gesetzt werden kann. Es existieren jedoch auch Hinweise, die einen Zusammenhang von Gewebeneubildung und β -Glucuronidase negieren bzw. in Frage stellen (2,37, 57, 82,93). Nicht nur Zellproliferation sondern auch Gewebeinvolution zeigen eine erhöhte β -Glucuronidase im Organ (6,27,32,47, 80,89). Umgekehrt können vermehrte Organkonzentrationen bzw. Aktivitäten der β -Glucuronidase sowohl Folge einer vermehrten Zellproliferation als auch eines gesteigerten Zellabbaus sein.

1.5. Spezielle Betrachtung der Serum- β -Glucuronidase

1.5.1. Normales Vorkommen im Serum

Dem ubiquitären Vorkommen der β -Glucuronidase in den Organen entspricht ein ebenso ubiquitäres Vorkommen in den Körperflüssigkeiten. Fishman et al. ist der Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität u.a. auch im Serum gelungen (26). Der Übertrittsmechanismus von der Zelle ins Blut ist unbekannt (46,61); die nicht organellengebundene β -Glucuronidase scheint leichter als das gebundene Enzym Zugang zum Blut zu haben (65).

Hinsichtlich Altersabhängigkeit und Geschlechtszugehörigkeit bestehen über die Serum- β -Glucuronidase Differenzen: während Nilius (59) im Verlauf des Lebens eine weitgehend gleichbleibende Enzymaktivität feststellt, kann Platt (65) einen steten Anstieg vom ersten bis zum achtzigsten Lebensjahr beobachten. Geschlechtsunterschiede in der Serum- β -Glucuronidase-Aktivität bestehen nach Nilius gering (59) und nach Fishman et al. (24) deutlich.

Der Einfluß der Östrogene auf die β -Glucuronidase ist erwähnt worden (1.4.2.). Dohrmann (10) berichtet parallel mit dem Cyclus bei Frauen im gebärfähigen Alter auftretende Enzymaktivitätsschwankungen im Serum, während der Schwangerschaft strebt die Serum- β -Glucuronidase bis zum Tag der Entbindung einem Maximalwert zu und kehrt binnen weniger Tage post partum zum Ausgangswert wieder zurück (10,68).

1.5.2. Pathologisch veränderte Aktivität der Serum- β -Glucuronidase

1.5.2.1. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus scheint mit erhöhter Serum- β -Glucuronidase einherzugehen (3), und zwar ist die Enzymaktivität bei Diabetikern gering vermehrt gegenüber der Norm, "verwilderter" Diabetes oder Diabetes mit klinisch manifesten Symptomen (Angina pectoris, Gangrän, Claudicatio intermittens) sind von stark erhöhter Serum- β -Glucuronidase-Aktivität gekennzeichnet. Dohrmann et al. (12) diskutieren einen Abstrom der β -Glucuronidase aus den untersuchten Organen Leber und Niere ins Blut bei künstlich erzeugtem Diabetes an Ratten, möglicherweise spiegelt die Aktivitätssteigerung der Serum- β -Glucuronidase einen gesteigerten Bedarf an Glucuronidierung wieder, da gleichzeitig ein erhöhter Glucuronsäurespiegel im Blut gefunden wird (13).

Als weitere Ursache für die Aktivitätssteigerung der Serum- β -Glucuronidase bei Diabetes mellitus kommt der gestörte Mucopolysaccharidstoffwechsel in Betracht. Berger (3) stellt die β -Glucuronidase in ein Regelkreismodell, wonach infolge Insulinmangels die Hyperglykämie die Mucopolysaccharidsynthese in den Gefäßwänden anregt, diese Mucopolysaccharide induzieren die sauren Hydrolasen, die sie dann wieder abbauen sollen. Eine ähnliche Theorie skizzieren auch Platt et al. (72), wenn sie die Entstehung der "plaques" mit dem Mucopolysaccharidstoffwechsel in Zusammenhang bringen. Arteriosklerotische Gefäßwände zeigen erhöhte β -Glucuronidase-Aktivität (4,64,86), sie können auch als Quelle für die Serum- β -Glucuronidase erwogen werden, wenn auch Kayahan (39) und Kresse et al. (45) ein vermehrtes Auftreten der β -Glucuronidase in arteriosklerotischen Veränderungen bestreiten. Es ist versucht worden, die Serumenzymaktivität mit anderen Parametern zu korrelieren, Berger (3), Dubach et al. (15), Fishman et al. (24), Hagenfeld et al. (28) und Woollen et al. (90,91) kommen zu gleichen Ergeb-

nissen und machen Geschlechtsabhängigkeit deutlich: bei Diabetikerinnen wird eine höhere Serum- β -Glucuronidase-Aktivität als bei männlichen Diabetikern ermittelt.

Nach Dohrmann et al. (13) und Jimenez et al. (35) scheinen Blutzucker und Serum- β -Glucuronidase keine parallelen Aktivitätsänderungen zu zeigen. Ist die Hyperglykämie jedoch Ausdruck einer entgleisten diabetischen Stoffwechsellaage, so normalisieren sich unter Therapie (Diät, Sulfonylharnstoffe, Insulin) Blutzucker und Serum- β -Glucuronidase im gleichen Tempo.

1.5.2.2. Leberkrankheiten

Bei zahlreichen Hepatopathien ist die Serum- β -Glucuronidase-Aktivität gesteigert, sodaß ihr keine differentialdiagnostische Bedeutung zukommt (10,60). Unter pathologischen Bedingungen kann ein passiver Ausstrom der β -Glucuronidase ins Blut analog zu den Zellschädigungszeichen Glutamatdehydrogenase (EC 1.4.1.2.), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (EC 2.6.1.1.), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (EC 2.6.1.2.) und Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27.) diskutiert werden (46). Im Vergleich zu den Serum-Enzymen, die eine Zellschädigung anzeigen, erreicht die β -Glucuronidase nach Kröner et al. (46) jedoch erst verspätet pathologische Werte, wogegen Nilius et al. (62) ein zeitlich früheres Auftreten der β -Glucuronidase im Serum beobachteten. Die β -Glucuronidase stammt aus den Zellpartikeln des zerstörten Leberbezirkes; die Serum- β -Glucuronidase strebt in dem Maße dem Normwert wieder zu, wie die Entzündung zum Stehen kommt (61,79).

Chronische Alkoholfuhr führt über eine Fettleber zur Leberzirrhose (74); die schon von Fishman et al. (24) konstatierte Aktivitätszunahme der Serum- β -Glucuronidase wird von Platt et al. (67) im Sinne eines gestörten Mucopolysaccharidstoffwechsels gedeutet; aufbauend auf Ergebnissen von Hauss wird eine gesteigerte "turn over"-Situation angenommen, wobei jedoch die Mucopolysaccharidsynthese relativ überwiegt; der Ausdruck dieser bindegewebigen Durchwucherung der Leber ist dann die Leberzirrhose.

1.5.2.3. Herzkrankheiten

Weil der Herzmuskel wie auch die übrige Muskulatur arm an β -Glucuronidase ist (10,48,60,78), rekrutiert sich die Serum- β -Glucuronidase unter normalen Umständen nicht aus diesem Gewebe. Dennoch haben Ravens et al. (76) an Hunden die

β -Glucuronidase im Herzmuskel untersucht und nach einigen Tagen, nachdem sie operativ Herzgefäße unterbunden haben und somit die Voraussetzungen für einen Herzinfarkt gesetzt haben, einen Anstieg der cytoplasmatischen und einen Aktivitätsabfall der partikelgebundenen β -Glucuronidase-Aktivität beobachtet. Woollen et al. (91) können nach Herzinfarkt eine pathologisch erhöhte Serum- β -Glucuronidase-Aktivität aufzeigen, die sich vorzugsweise auf weibliche Patienten beschränkt. Leipold et al. (48) berichten von unveränderter Serum- β -Glucuronidase bei Herzinfarkt.

1.6. Spezielle Betrachtung der Urin- β -Glucuronidase

Aufgrund der verschieden starken β -Glucuronidase-Lokalisation in der Niere - Glomerula arm und Tubuluszellen reich an β -Glucuronidase - äußern Kramer et al. (44) und Platt et al. (71) die Vermutung, daß an Hand der Urin- β -Glucuronidase-Aktivität glomeruläre von pyelonephritischen Nierenerkrankungen unterschieden werden können. Raab (75) zitiert zahlreiche Autoren, welche die gesteigerte Urin- β -Glucuronidase differentialdiagnostisch betrachten: alle akut entzündlichen und toxischen Nierenerkrankungen, Pyelonephritis, Nieren-Tbc und Harnwegtumoren. Schwere Nierenerkrankungen, die mit hoher Zellzerstörung einhergehen wie z.B. akutes Nierenversagen oder Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation bedingen einen signifikanten Urin- β -Glucuronidase-Aktivitätsanstieg.

Der diagnostische Wert der Urin- β -Glucuronidase ist eingeschränkt, wenn man von der genannten Ausnahme bei der Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation absieht, wo die Urin- β -Glucuronidase anderen klinisch-chemischen Parametern überlegen ist. Mattenheimer (54) detet eine vermehrte Urin- β -Glucuronidase lediglich als einen nicht sicheren Hinweis auf mögliche Harnwegerkrankung, zumal die Enzymausscheidung erheblichen Tagesschwankungen unterworfen ist, und die Existenz von Inhibitoren im Urin nicht ausdiskutiert ist (77).

1.7. Spezielle Betrachtung der Speichel- β -Glucuronidase

Da sekretorische Organe eine hohe β -Glucuronidase-Aktivität aufweisen, ist anzunehmen, daß auch die Speicheldrüsen eine rege β -Glucuronidase-Aktivität zeigen. Takagi kann aufgrund histochemischer Untersuchungen das Enzym in den

Tubuli und Ausführungsgängen der Glandula submaxillaris nachweisen, und de Cecco ergänzend dazu in dem von der Parotis produzierten Speichel; Östrogene, Progesterone und Gonadotropin steigern die Enzymaktivität in der Glandula submaxillaris und setzen sie in der Parotis gleichzeitig herab (10, Zitat nach Dohrmann).

1.8. Fragestellung

Die Bestimmung der β -Glucuronidase hat bisher keine Bedeutung für die klinisch-chemische Diagnostik gefunden, weil die Methode zur Aktivitätsmessung sehr zeitraubend gewesen ist, und andere klinische Parameter in Diagnosestellung, Verlaufsbeurteilung und Prognose die β -Glucuronidase übertreffen.

Mit der nach Mead, Smith und Williams (55) modifizierten Methode sollte die β -Glucuronidase bei 284 Personen untersucht werden. Die Ziele, die dabei verfolgt wurden, waren erstens eine zeitliche Verkürzung des Bestimmungsganges und zweitens die Frage nach diagnostischer Bedeutung der β -Glucuronidase bei Diabetes, einigen Leber- und Herzerkrankungen. In beschränktem Umfang war auch eine Verlaufsbetrachtung der β -Glucuronidase während des stationären Aufenthaltes bei Patienten der Leber- und der Herzstation möglich.

2. Material und Methode

2.1. Geräte

Serum-, Urin- und Speichelproben wurden in Polyäthylenröhrchen aufbewahrt. Abzentrifugiert wurden diese Proben in der Kühltzentrifuge Universal Junior II KS, Firma Christ, Osterode.

Kristalline Chemikalien wurden auf der Präzisionswaage Sartorius-Werke AG, Göttingen mit einem optischen Anzeigebereich von 0 - 100 mg abgewogen. Der pH-Wert der frisch angesetzten Puffer wurde mit dem Labor-pH-Meter der Firma Knick, Berlin und der Glaselektroden-Meßkette Ingold Typ 405 kontrolliert.

Im Schüttelinkubator der Firma Braun Melsungen wurden die Versuchsansätze inkubiert.

Photometriert wurde im Spektralphotometer Modell PMQ II, Firma Zeiss, Oberkochen, wobei das Fluoreszenzzusatzgerät ZFM 4 verwendet wurde. OS-Küvetten mit 1 cm innerer Kantenlänge standen zur Verfügung.

2.2. Chemikalien

Zur Erstellung der Eichkurve waren Chininsulfat (Firma Fluka, Schweiz) und 4-Methylumbelliferon (MU), rein (Firma Schuchardt, München) nötig. Der Natrium-Formiatpuffer wurde mit NaOH Titrisol, 98%iger Ameisensäure (beides von Firma Merck, Darmstadt) und mit bidestilliertem Wasser der Güte unterhalb 0,1 Mikro-Siemens (aus den Destillationsanlagen der Universitätskliniken, Mainz) hergestellt. Glycin stammte von der Firma Serva, Heidelberg. 4-Methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronid p.a. (MUGA) war bei der Firma Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA, erhältlich.

2.3. Personenauswahl

Alle Serum- und Urinproben, die für die Erstellung der Bestimmungsmethode nötig waren, wurden freundlicherweise vom Zentrallabor der Universitätskliniken, Mainz, überlassen; es wurden Mischseren von sechs bis zwölf Patienten verwendet. Die Speichelproben stammten von einigen Personen des Labors.

155 Personen beider Geschlechter im Alter zwischen 15 und 63 Jahren bildeten das Kontrollkollektiv (Anamnese und ärztliche Untersuchung vom Institut für Doku-

mentation und Statistik, Mainz durchgeführt; die Serumlaborbefunde kamen vom Zentrallabor).

In einem Zeitraum von sechs Wochen wurde bei 57 Diabetikern, die zur Erst- bzw. Kontrolluntersuchung in die Diabetesberatung kamen, die β -Glucuronidase untersucht.

In einem Zeitraum von sechs Wochen wurde bei 72 Patienten, die wegen Erkrankungen der Leber oder des Herzens stationär in der II. Medizinischen Klinik behandelt wurden, die β -Glucuronidase-Aktivität gemessen. Im Gegensatz zu den Kontroll- und Diabetikerkollektiven konnte die β -Glucuronidase der stationären Patienten im Verlaufe des Klinikaufenthaltes mehrfach bestimmt werden.

Innerhalb der Kollektive von Herz- und Leberkranken wurden entsprechend der im Vordergrund stehenden Diagnosen akute Hepatitis, chronische Hepatitis, Leberzirrhose sowie Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, Klappenfehler des linken Herzens und Coronarstenose Klassen gebildet.

Unter den 36 Leberkranken befanden sich 16 Personen mit akuter Hepatitis, 8 Personen mit chronischer Hepatitis und 6 Personen mit Leberzirrhose. Zur Klasseneinteilung dienten die führenden Diagnosen; in manchen Fällen kamen mehrere Diagnosen zusammen: sechs Patienten mit chronischer Hepatitis litten zudem an histologisch gesicherter Leberverfettung und Zirrhose. Cholestatischer Einschlag war in zwei Fällen mit chronischer und einmal mit akuter Hepatitis kombiniert. Da von verschiedenen Erkrankten im Verlaufe des stationären Aufenthaltes an mehreren Tagen die Bestimmung der Serum- β -Glucuronidase möglich war, konnte eine Aussage über die Werte bei Aufnahme und über die maximalen Aktivitätssteigerungen (Maximalwerte) während des stationären Aufenthaltes gemacht werden. Zu den Aufnahmewerten wurden die Meßwerte vom ersten Tag und, soweit dieses nicht möglich war, vom zweiten bzw. dritten Tag gezählt.

Angaben über Diagnose, Anamnese und klinische Meßwerte der Serodiagnostik wurden den Krankenblättern entnommen.

2.4. Prinzip der Bestimmungsmethode

Blut wurde bei den Personen zwischen sechs und neun Uhr morgens entnommen. Nach Anlegen einer Staumanschette am Oberarm wurde die vena cubiti punktiert; das Blut wurde in Polyäthylentröhrchen aufgefangan. Da Thrombocyten viel β -

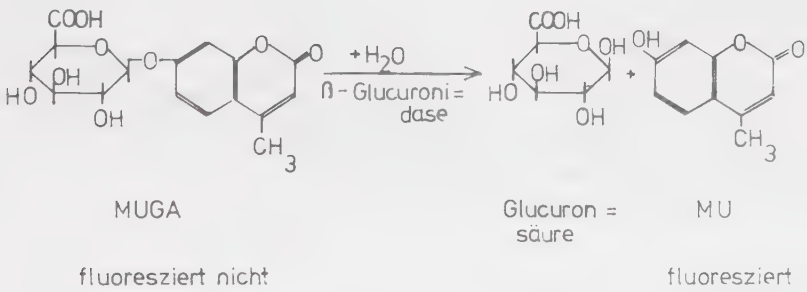
Glucuronidase beinhalten, wurde aus Gründen der Einheitlichkeit (11) innerhalb von vier Stunden eine weitgehende Thrombocytolyse abgewartet, bevor das Blut abzentrifugiert wurde. Soweit nicht sofort untersucht wurde, wurde das Serum bei minus 20°C bis zu maximal drei Monaten eingefroren. Innerhalb dieser Zeit trat kein Aktivitätsabfall ein (15).

Als Urinprobe wurde Mittelstrahlurin genommen; der Urin wurde morgens zwischen sechs und neun Uhr produziert und anschließend abzentrifugiert. Nicht sofort untersuchte Proben wurden eingefroren. Mit den Speichelproben wurde analog verfahren: nachdem sie abzentrifugiert waren, wurden sie eingefroren aufbewahrt, soweit nicht eine sofortige Enzymaktivitätsbestimmung durchgeführt wurde.

Die hydrolytische Wirkung der β -Glucuronidase in Serum, Urin oder Speichel auf das Substrat 4-Methyl-umbelliferyl-glucuronid (MUGA) wurde fluorometrisch über das von dem Enzym freigesetzte 4-Methyl-umbelliferon gemessen, welches in alkalischer Lösung fluoresziert. Das pH-Optimum der Fluoreszenzentwicklung lag bei pH 10,2.

MUGA fluoresziert nicht; diesen Umstand macht man sich bei der Aktivitätsmessung zunutze :

Abbildung 1



Die Fluoreszenz wurde mit dem Spektralphotometer und dem Fluoreszenzzusatzteil gemessen; die Wellenlänge der anregenden Strahlung liegt bei 365 nm, die der angeregten bei 460 nm. Die Spaltweite war auf 0,43 mm eingestellt. Abgelesen wurde am Anzeigegerät % Transmission unter Benutzung eines Chinistandards, der

als 2 gamma/ml 0,1 n H₂SO₄ haltige Lösung angesetzt worden ist. Über den ermittelten Fluoreszenzwert wurde in entsprechender Eichkurve (Abbildung 2 und Tabelle 1) die Konzentration der freigesetzten Menge 4-Methyl-umbelliferon abgelesen, welche ein Maß für die Enzymaktivität darstellte.

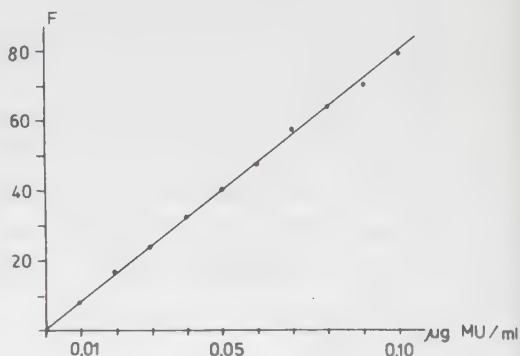
Eine Einheit E wurde definiert als

die Menge freigesetzten Produkts 4-Methyl-umbelliferon gemessen in Mikromol pro Minute und 1000 ml Analysenprobe (Serum, Urin, Speichel).

Unter der Berücksichtigung der Eichkurve, des Molekulargewichtes von 4-Methyl-umbelliferon, der Versuchsdauer von 15 min, der Serummenge 0,1 ml und des Volumens des Ansatzes (15,1 ml) ergab sich für die Berechnung der β -Glucuronidase-Aktivität

$$E = \frac{0,1 \cdot 1000 \cdot 15,1}{476,174 \cdot 80 \cdot 15 \cdot 0,1} \cdot (F_A - F_L) = 0,07 (F_A - F_L)$$

wobei F_A die Fluoreszenz der Analyse und F_L die Fluoreszenz des zugehörigen Leerwertes bedeuten.



10 ⁻⁶ g MU/ml	F
0,01	8,3
0,02	17,2
0,03	24,4
0,04	32,7
0,05	40,2
0,06	47,6
0,07	57,0
0,08	63,5
0,09	70,0
0,10	78,1

Abbildung 2, Tabelle 1: Eichkurve für 4-Methyl-umbelliferon

2.5. Statistische Auswertung

Geschlechtsunterschiede bei Kontrollpersonen und Diabetikern, sowie der Einfluß oraler Kontrazeptiva bei weiblichen Kontrollpersonen wurden mit dem t-Test für unverbundene Stichproben auf Signifikanz geprüft (43).

Um Patientengruppen verschiedener Diagnosen hinsichtlich ihrer β -Glucuronidase-Aktivität zu vergleichen, wurden aus dem Kontrollkollektiv nach der "matched

Pairs"-Technik zu jedem Fall einer diagnostischen Gruppe zwei Paarlinge gleichen Geschlechts und etwa gleichen Alters ausgewählt. Die n Kranken wurden dann jeweils mit den $2n$ Gesunden mit Hilfe des t -Tests für unverbundene Stichproben verglichen (43). Dieses Vorgehen ließ sich nicht konsequent verwirklichen, wenn im Kontrollkollektiv nicht genügend gleichaltrige Personen waren. In diesem Falle ließ sich zu einzelnen Kranken nur je ein einzelner Kontrollfall finden. Umgekehrt fehlten bei manchen Fällen der Kranken-Gruppen einzelne Meßwerte, sodaß die Vergleichsgruppen mehr als doppelt so groß wurden.

Beim Vergleich von Patienten mit verschiedenen Behandlungsformen innerhalb der Diabetiker und von drei Gruppen der Lebererkrankungen wurden Mittelwertunterschiede mit Hilfe der einfachen Varianzanalyse auf Signifikanz geprüft (43).

Der Zusammenhang zwischen β -Glucuronidase-Aktivität und anderen Laborwerten sowie ihre Abhängigkeit vom Alter wurden mit der Produkt-Moment-Korrelation geprüft.

Bei allen Verfahren wurde ein Ergebnis als statistisch signifikant bezeichnet, wenn die betreffende Prüfgröße den bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,01$ tabellierten Wert erreichte oder überschritt, und als statistisch auffällig, wenn die Prüfgröße gleich oder größer ausfiel als der bei $p = 0,05$ tabellierte Tabellenwert.

3. Ergebnisse

3.1. Übersicht über die Aktivitätsbestimmung der β -Glucuronidase im Serum, Urin und Speichel

Nach Austestung (s.u.) erwies sich zur Enzymaktivitätsbestimmung folgender Reaktionsansatz als geeignet: Es wurden 4,5 ml Natrium-Formiatpuffer pH 3,0 (bei 20°C) und einer Ionenstärke $J = 0,005$ zu 0,5 ml 0,001 M wässrige MUGA-Lösung in je drei Reagenzgläser pipettiert und 10 Minuten bei 38°C vorinkubiert.

Anschließend wurden je 0,1 ml Serum in zwei der drei Röhrchen gegeben, das dritte mitgeführte Röhrchen erhielt als deklarierter Leerwert kein enzymatisches Material.

Nach der eigentlichen Inkubationszeit von 15 Minuten im Schüttelinkubator wurden die enzymatischen Reaktionen mit 10 ml 1 M Glycinpuffer pH 10,5 gestoppt. Der Ansatz des Leerwertes erhielt jetzt 0,1 ml Analysenprobe.

Im alkalischen Milieu wurde nicht nur die enzymatische Reaktion unterbrochen, das freigesetzte 4-Methyl-umbelliferon fluoreszierte zudem bei 10,2 maximal.

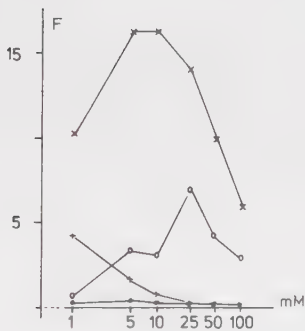
Es schloß sich die Fluoreszenzmessung an.

Die Untersuchungen der Urin- und Speichelproben wurden analog zur Bestimmung der Serumproben gehandhabt. Folgendes wurde verändert:

- a) Urinproben: es wurde Natrium-Formiatpuffer mit der Ionenstärke $J = 0,2$ und mit einem pH = 4,3 verwendet,
- b) Speichelproben: es wurde Natriumformiatpuffer mit der Ionenstärke $J = 0,1$ und mit einem pH = 4,2 benutzt.

3.1.1. Auswahl des Formiatpuffers

Aus einer Reihe von Puffern wurde der Formiatpuffer als günstigster ausgesucht. Der Acetatpuffer schied von vornherein wegen zu geringer Pufferkapazität bei pH 3,0 aus. Bei Verwendung der Puffer Glycin/HCl, KCl/HCl und Citrat/HCl entwickelte sich nur geringe Aktivität, was besonders für den Citrat/HCl-Puffer zutraf. Letzteres wurde dadurch erklärt, daß Citrat die β -Glucuronidase hemmt (56) (Abbildung 3, Tabelle 2).



Puffer		mM					
		1	5	10	25	50	100
x—x	Na - Formiat	10,1 (3,7)	16,2 (3,3)	16,1 (3,3)	13,9 (3,9)	9,8 (3,3)	5,9 (3,2)
o—o	Gly/HCl	0,6 (4,5)	3,4 (3,9)	2,9 (3,9)	7,0 (3,3)	4,3 (3,3)	3,0 (3,3)
+—+	Citrat/HCl	4,2 (3,6)	1,7 (3,4)	0,8 (3,4)	0,3 (5,1)	0,2 (4,7)	0,1 (4,7)
•—•	KCl/HCl	0,4 (5,4)	0,5 (5,1)	0,4 (5,1)	0,4 (5,1)	0,4 (5,1)	0,3 (4,7)

Abbildung 3, Tabelle 2: Serum- β -Glucuronidaseaktivität in Abhängigkeit von Puffer und Pufferkonzentration. Der pH-Wert aller Puffer betrug 3,1. Nach Zugabe von Serum kam es zu unterschiedlichen pH-Verschiebungen. Diese pH-Werte sind in der Tabelle in Klammern angegeben.

Das pH-Optimum war für verschiedene Ionenstärken nicht konstant. Bei abnehmender Ionenstärke zeigte sich eine Drift des pH-Optimum zum Säuren. Weiterhin zeigen Abbildung 4a und b und Tabelle 3a und b unterschiedliche Enzymaktivitätsausbeute, wenn Ionenstärke und pH unabhängig und abhängig voneinander variiert wurden. Wurden die Aktivitätsgipfel der pH-Optimumkurven bei verschiedenen Ionenstärken verbunden, so resultierte daraus in dem einen Falle ein paraboloider Verlauf, in dem anderen Falle jedoch ein nicht paraboloider Verlauf.

Diese Diskrepanzen wurden nicht weiter untersucht, da in beiden Fällen eine Ausweitung in minimale Ionenstärken für die praktischen Belange unvorteilhaft war. Denn die Pufferkapazität des Serums trat hier überlagernd mit der des Puffers in Konkurrenz, so daß die individuelle Pufferkapazität des Serums den pH des Ansatzes von Untersuchung zu Untersuchung verschieden stark verschob.

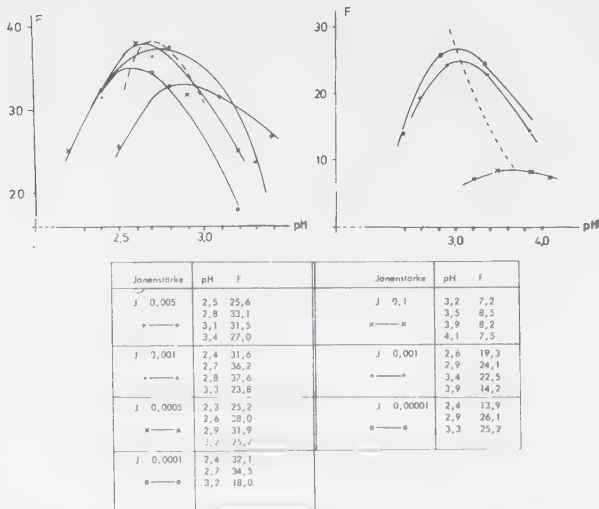


Abbildung 4a und 4b, Tabelle 3a und 3b: pH- und Ionenstärkeoptimum der Serum-B-Glucuronidase. Die unterbrochene Linie stellt die resultierende Kurve dar, wenn die einzelnen pH-Optima bei verschiedenen Ionenstärken verbunden werden. Abbildung 4a und Tabelle 3a legen für die resultierende Kurve einen paraboloiden, Abbildung 4b und Tabelle 3b einen nicht-paraboloiden Verlauf nahe.

3.1.2. Substratkonzentration

Unter Verwendung eines pool-Serum von sechs Patienten wurde die Enzymkinetik bei verschiedenen Substratkonzentrationen getestet. Die Auswertung nach Lineweaver-Burk ergab einen $K_m = 0,133 \text{ mM}$. (Abbildung 5 und Tabelle 4).

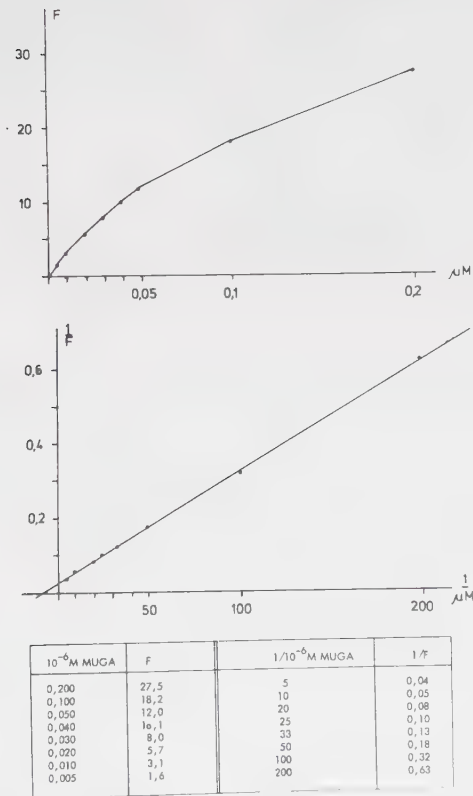
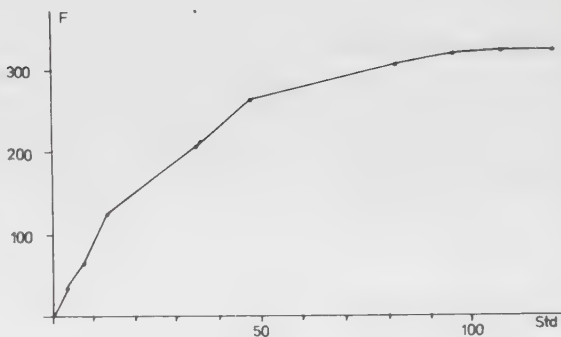


Abbildung 5a und 5b, Tabelle 4a und 4b: Serum- β -Glucuronidaseaktivität in Abhängigkeit von verschiedenen Substratkonzentrationen (a) und dazugehöriges Lineweaver-Burk-Diagramm

3.1.3. Zeitkinetik

Abbildung 6 und Tabelle 5 zeigen, daß die β -Glucuronidaseaktivität des Serums bei der Inkubationstemperatur von 38°C über Stunden praktisch ohne Verlust blieb.

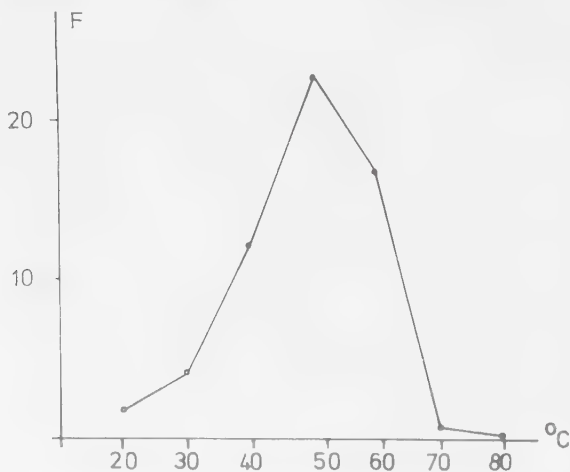


Stunden	F
0	0,0
4	32,2
8	63,5
14	122,1
35	205,8
48	259,0
82	303,0
96	316,4
108	318,7
120	314,8

Abbildung 6, Tabelle 5: Zeitkinetik der Serum- β -Glucuronidaseaktivität.

3.1.4. Temperaturkinetik

Das Temperaturoptimum der Serum- β -Glucuronidase lag in der Nähe von 50°C (Abbildung 7 und Tabelle 6).



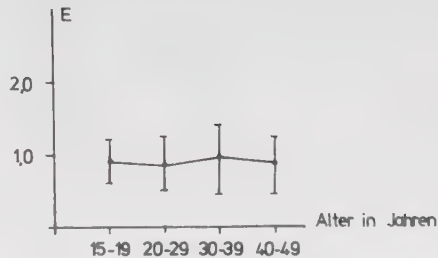
°C	F
20	1,8
30	4,2
40	12,1
50	22,8
60	16,9
70	0,7
80	0,0

Abbildung 7, Tabelle 6: Temperaturoptimum der Serum- β -Glucuronidaseaktivität

3.2. Serum- β -Glucuronidase

3.2.1. Kontrollwert

Es wurde der Einfluß von Alter, Geschlecht und oraler Antikonzeptiva auf die Serum- β -Glucuronidase untersucht. Mit zunehmendem Alter blieb die Enzymaktivität weitgehend gleich; Geschlechtsunterschiede hinsichtlich der Serum- β -Glucuronidase bestanden nicht (Abbildungen 8 und 9 und Tabellen 7 und 8).



Zahl der Kontrollpersonen	Alter	Serum- β -Glucuronidaseaktivität
n	Jahre	$\bar{x} \pm s E$
155	15-63	$0,88 \pm 0,37$
22	15-19	$0,87 \pm 0,25$
43	20-29	$0,83 \pm 0,31$
50	30-39	$0,93 \pm 0,47$
26	40-49	$0,82 \pm 0,39$

Abbildung 8, Tabelle 7: Einfluß des Alters auf die Serum- β -Glucuronidaseaktivität. $r = 0,050$ (s. Tabelle 10).

Alter	männlich		weiblich		Statistische Auswertung	
	Zahl der Kontrollpersonen	Serum- β -Glucuronidaseaktivität	Zahl der Kontrollpersonen	Serum- β -Glucuronidaseaktivität		
Jahre	n	$\bar{x} \pm s E$	n	$\bar{x} \pm s E$	t	p
15-19	18	$0,89 \pm 0,23$	4	$0,76 \pm 0,36$	0,927	n.s.
20-29	22	$0,92 \pm 0,31$	21	$0,73 \pm 0,28$	2,106	0,05
30-39	25	$0,94 \pm 0,45$	25	$0,92 \pm 0,49$	0,150	n.s.
40-49	10	$0,84 \pm 0,30$	16	$0,81 \pm 0,45$	0,186	n.s.
50-59			8	$0,76 \pm 0,22$		
60-63			6	$1,10 \pm 0,40$		
15-63	76	$0,91 \pm 0,34$	79	$0,84 \pm 0,40$	0,712	n.s.

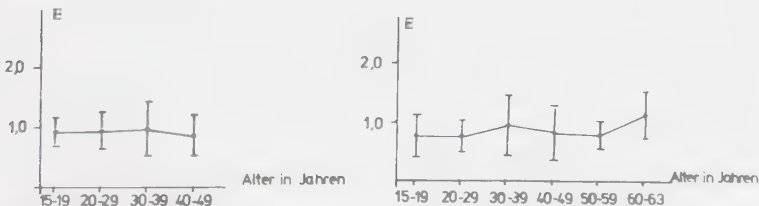
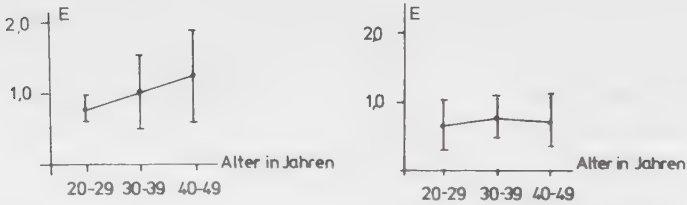


Abbildung 9, Tabelle 8: Geschlechtsunterschiede der Serum- β -Glucuronidaseaktivität getrennt nach dem Alter

Die in den oralen Antikonzeptiva enthaltene Menge an weiblichen Sexualhormonen reichte nicht aus, um Unterschiede der Enzymaktivität bei Frauen, die die "Pille" nehmen, statistisch zu sichern (Abbildung 10 und Tabelle 9).



	weibliche Kontrollpersonen				Statistische Auswertung	
	mit		ohne			
Alter	oralen Antikonzeptiva		orale Antikonzeptiva			
Jahre	Anzahl	$\bar{x} \pm s \pm E$	Anzahl	$\bar{x} \pm s \pm E$	t	p
20-39	17	$0,90 \pm 0,40$	24	$0,77 \pm 0,47$	0,927	n.s.
20-29	9	$0,78 \pm 0,19$	10	$0,64 \pm 0,34$	1,090	n.s.
30-39	8	$1,03 \pm 0,53$	14	$0,75 \pm 0,30$	1,595	n.s.
40-49	3	$1,27 \pm 0,63$	12	$0,71 \pm 0,35$	2,138	n.s.

Abbildung 10, Tabelle 9: Einfluß der Antikonzeptiva auf die Serum- β -Glucuronidaseaktivität bei weiblichen Kontrollpersonen getrennt nach dem Alter.

Weiterhin wurde versucht, zu einigen Parametern wie Blutdruck, Triglyceride, Cholesterin, Gesamtbilirubin, Quickwert und den Enzymen Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase, Kreatinkinase und Glutamatdehydrogenase mögliche Korrelationen aufzudecken. Lediglich die GLDH ($r = 0,191$ bei 151 Personen) und der systolische Blutdruck ($r = 0,192$ bei 150 Personen) zeigten statistisch auffällige Zusammenhänge (Tabelle 10).

Anzahl der Kontrollpersonen	Korrelation der Serum- β -Glucuronidase mit	Korrelationskoeffizient
n		r
155	Alter	0,050
155	Geschlecht	-0,092
150	systolischer Blutdruck	0,192 *
150	diastolischer Blutdruck	0,114
119	Triglyceride	-0,057
123	Cholesterin	0,099
150	CK	-0,032
150	SGOT	0,118
151	SGPT	0,081
151	GLDH	0,192 *
86	Gesamt-Bilirubin	-0,083
153	Quick	0,077
82	Urin- β -Glucuronidase	-0,186
93	Speichel- β -Glucuronidase	-0,145

Tabelle 10: Zusammenstellung der Korrelationskoeffizienten, die die Serum- β -Glucuronidaseaktivität betreffen.

3.2.2. Pathologische Befunde

3.2.2.1. Diabetes mellitus

Die Serum- β -Glucuronidase ist bei Diabetes mellitus mit einem Mittelwert $\bar{x} = 1,62$ E und einer Standardabweichung $s = \pm 1,10$ E gegenüber der Norm signifikant erhöht ($t = 4,314$; $FG = 96$; $p < 0,01$) (Tabelle 11).

Kontrollgruppe		Diabetiker		Statistische Auswertung
Anzahl	Serum- β -Glucuronidaseaktivität	Anzahl	Serum- β -Glucuronidaseaktivität	
n	$\bar{x} \pm s$ E	n	$\bar{x} \pm s$ E	t p
41	$0,85 \pm 0,36$	57	$1,62 \pm 1,10$	$4,314 < 0,01$ **

Tabelle 11: Serum- β -Glucuronidaseaktivität bei Diabetikern

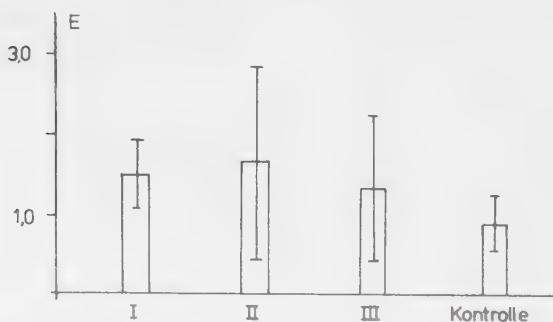
** statistisch signifikant

Hinsichtlich des Geschlechts bestanden innerhalb der Diabetiker keine auffälligen Aktivitätsunterschiede (Tabelle 12).

männliche Diabetiker		weibliche Diabetiker		Statistische Auswertung
Anzahl n	Serum- β -Glucuronidaseaktivität $\bar{x} \pm s \text{ E}$	Anzahl n	Serum- β -Glucuronidaseaktivität $\bar{x} \pm s \text{ E}$	
22	1,64 $\pm$ 1,29	35	1,59 $\pm$ 0,75	0,165 n.s.

Tabelle 12: Einfluß des Geschlechts auf die Serum- β -Glucuronidaseaktivität bei Diabetikern

Als ein grober Gradmesser für den Schweregrad des Diabetes mellitus wurde die Therapiebedürftigkeit herangezogen; es wurden drei Klassen aufgestellt (Abbildung 11 und Tabelle 13) (s. auch Dubach (15))



		Zahl der Diabetiker n	Serum- β -Glucuronidaseaktivität $\bar{x} \pm s \text{ E}$
Klasse	Therapieform		
I	Diet	9	1,51 $\pm$ 0,42
II	orale Anti = diabetica	34	1,66 $\pm$ 1,20
III	Insulin	9	1,34 $\pm$ 0,90

$$F = 0,201 < F_{0,05; 2, 49} \text{ n.s.}$$

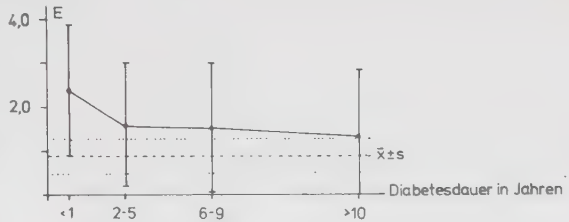
Abbildung 11, Tabelle 13: Serum- β -Glucuronidaseaktivität bei Diabetikern geordnet nach Therapiebedürftigkeit in drei Klassen. Rechts in der Abbildung zum Vergleich der Mittelwert mit Standardabweichung der Serum- β -Glucuronidaseaktivität von 155 Kontrollpersonen.

Klasse I enthielt alle Diabetiker, die allein diätetisch eingestellt waren, Klasse II diejenigen, die orale Antidiabetica einnahmen, und Klasse III die insulintherapierten Diabetiker.

Die Varianzanalyse erbrachte keine signifikanten Differenzierungsmöglichkeiten :

$$F = 0,201 < F_{0,05} ; 2, 49$$

Eine statistisch auffällige negative Korrelation hatte die Dauer des Diabetes zur Serum- β -Glucuronidase ($r = -0,300$). Besonders diejenigen Patienten, bei denen der Diabetes mellitus neu entdeckt wurde, fielen durch erhöhte Serum- β -Glucuronidasaktivität auf (Abbildung 12, Tabelle 14).



Diabetes bekannt seit	Zahl der Diabetiker	Serum- β -Gluco = ronidaseaktivität
Jahre	n	$\bar{x} \pm s$ E
1	5	$2,38 \pm 1,48$
2-5	19	$1,58 \pm 1,39$
6-9	9	$1,51 \pm 1,45$
10	16	$1,32 \pm 1,50$

Abbildung 12, Tabelle 14 : Serum- β -Glucuronidaseaktivität bei Diabetikern in Abhängigkeit von der Dauer des Diabetes mellitus. Zum Vergleich ist durch die drei Parallelen der Mittelwert mit Standardabweichung der Serum- β -Glucuronidaseaktivität von 155 Kontrollpersonen eingezeichnet.

Blutzucker, Triglyceride und Cholesterin sowie Blutdruck korrelierten nicht mit der Serum- β -Glucuronidaseaktivität (Tabelle 15).

Anzahl der Diabetiker	Korrelation der Serum- β -Glu = ronidase mit	Korrelations = koeffizient
n		r
57	Alter	-0,017
57	Geschlecht	0,024
53	Blutzucker	0,254
43	Triglyceride	0,119
33	Cholesterin	-0,027
33	systolischer Blutdruck	-0,001
33	diastolischer Blutdruck	0,163
51	Urin- β -Glucuronidase	0,191
43	Speichel- β -Glucuronidase	-0,004
47	Diabetesdauer	-0,297 *

Tabelle 15 : Zusammenstellung der Korrelationskoeffizienten, die die Serum- β -Glucuronidaseaktivität bei Diabetikern betreffen.

* statistisch auffällig

3.2.2.2. Lebererkrankungen

Tabelle 16 zeigt, daß bei akuter Hepatitis im Augenblick der stationären Aufnahme die Serum- β -Glucuronidaseaktivität statistisch erhöht war ($t = 4,816$, $FG = 6$, $p < 0,01$): $\bar{x} = 1,97 \pm 1,20$ E gegenüber $\bar{x} = 0,91 \pm 0,35$ E bei Gesunden

Kontrollpersonen		Diagnose	Patienten der Leberstation					
			Aufnahmewert			Enzymaktivitätspiegel		
Anzahl	Serum- β -Glucuronidaseaktivität	Diagnose	Anzahl	Serum- β -Glucuronidaseaktivität	Statistische Auswertung	Anzahl	Serum- β -Glucuronidaseaktivität	Statistische Auswertung
n	$\bar{x} \pm s$ E		n	$\bar{x} \pm s$ E	t p	n	$\bar{x} \pm s$ E	t p
34	$0,91 \pm 0,35$	akute Hepatitis	8	$1,97 \pm 1,20$	$4,816 < 0,01^{**}$	16	$3,25 \pm 2,39$	$3,698 < 0,01^{**}$
15	$0,93 \pm 0,33$	chronische Hepatitis	8	$1,57 \pm 0,96$	$2,355 < 0,05^{*}$	8	$1,73 \pm 0,87$	$3,235 < 0,01^{**}$
20	$0,90 \pm 0,36$	Zirrhose	11	$1,78 \pm 0,98$	$3,576 < 0,01^{**}$	11	$1,94 \pm 0,95$	$4,367 < 0,01^{**}$
10	$0,83 \pm 0,25$	Zirrhose bei chron. Hepatitis	5	$1,90 \pm 1,08$	$3,762 < 0,01^{**}$	5	$2,04 \pm 0,99$	$3,081 < 0,01^{**}$
9	$1,02 \pm 0,37$	Zirrhose ohne chron. Hepatitis	6	$1,35 \pm 0,59$	1,355 n.s.	6	$1,80 \pm 0,91$	$2,352 < 0,05^{*}$

Tabelle 16: Die Serum- β -Glucuronidaseaktivität bei verschiedenen Leberkrankheiten unterteilt nach Enzymaktivitäten bei Aufnahme in die Klinik und nach Enzymaktivitäten mit maximaler Abweichung während der Behandlung in der Klinik.

** statistisch signifikant gegenüber gesunden Kontrollgruppen

* statistisch auffällig gegenüber gesunden Kontrollgruppen

Dagegen war die Enzymaktivität der chronischen Hepatitis zu diesem Zeitpunkt nur statistisch auffällig erhöht ($t = 2,355$; $FG = 6$; $p < 0,05$; statistisch auffällig): $\bar{x} = 1,57$ E, $\pm 0,96$ E gegenüber $0,93 \pm 0,33$ E bei Gesunden. War die chronische Hepatitis jedoch mit Leberzirrhose vergesellschaftet, so fiel sie durch eine signifikante Steigerung der Serum- β -Glucuronidaseaktivität auf ($t = 3,762$; $FG = 3$, $p < 0,01$; statistisch signifikant): $\bar{x} = 1,90 \pm 1,08$ E im Vergleich zu den matched pairs mit $0,83 \pm 0,25$ E.

Entsprechend waren alle während der stationären Behandlung aufgetretenen maximalen Aktivitätssteigerungen bei akuter Hepatitis, chronischer Hepatitis und Zirrhose signifikant und bei Zirrhose ohne chronische Hepatitis statistisch auffällig gegenüber den Kontrollpersonen gesteigert. Die Varianzanalyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den 5 Lebererkrankungen: $F = 0,011 < F_{0,05; 2, 26}$. Es fiel auf, daß die Transaminasen zum Zeitpunkt der Patientenaufnahme in der Klinik ohne Ausnahme bei akuter Hepatitis pathologisch erhöht waren, während die Serum- β -Glucuronidase in drei Fällen im Normbereich lag.

Bei fünf akuten Hepatitiden strebte die Serum- β -Glucuronidase im Zeitraum der stationären Behandlung einem Aktivitätsgipfel zu, der im Vergleich zu dem der SGPT verspätet auftrat. Ebenfalls die Rückkehr zur Norm verzögerte sich bei der β -Glucuronidase: als die SGPT schon wieder unauffällige Werte erreicht hatte, war die β -Glucuronidase noch erhöht (Abbildung 13, Tabelle 17).

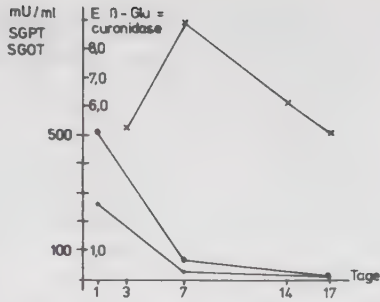


Abbildung 13, Tabelle 17: Klinisch chemische Parameter eines 23-jährigen Patienten mit akuter Hepatitis. Gegenüber den anderen aufgeführten Meßwerten zeigt die Se = Serum- β -Glucuronidaseaktivität einen verzögerten Anstieg zum Aktivitätsgipfel und einen verzögerten Trend zur Normalisierung.

Anhaltend erhöhte β -Glucuronidaseaktivität konnte bei Leberzirrhose festgestellt werden (Abbildung 14, Tabelle 18).

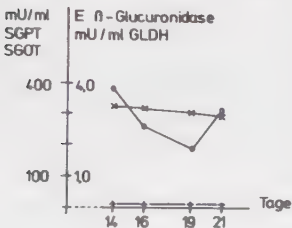


Abbildung 14, Tabelle 18: Klinisch chemische Parameter eines 43-jährigen Patienten mit einer primär bilären Leberzirrhose. Die pathologische Aktivitätssteigerung der Serum- β -Glucuronidase bei der Leberzirrhose ist möglicherweise Ausdruck eines gesteigerten Bindegewebstoffwechsels in der Leber.

3.2.2.3. Herzerkrankungen

Unter den 36 Patienten der Herzstation ließen sich entsprechend den Diagnosen folgende Klassen bilden: 12 Patienten mit Herzinfarkt, 9 mit Herzinsuffizienz, 8 mit Mitral- und/oder Aortenklappenfehlern und 6 Patienten mit Coronarstenose.

Die Serum- β -Glucuronidase war bei diesen Herzerkrankungen weitgehend unauffällig. Tabelle 19 gibt die Ergebnisse zusammenfassend wieder.

Kontrollpersonen		Diagnose	Patienten der Herzstation					
			Aufnahmewert			Enzymaktivitätspiegel		
Anzahl	Serum- β -Glucuronidaseaktivität		Anzahl	Serum- β -Glucuronidaseaktivität	Statistische Auswertung	Anzahl	Serum- β -Glucuronidaseaktivität	Statistische Auswertung
n	$\bar{x} \pm s \pm E$		n	$\bar{x} \pm s \pm E$	t p	n	$\bar{x} \pm s \pm E$	t p
15	$0,92 \pm 0,32$	Herzinfarkt	9	$1,00 \pm 0,37$	0,560 n.s.	8	$1,14 \pm 0,27$	1,652 n.s.
15	$0,89 \pm 0,34$	Herzinsuffizienz	5	$1,06 \pm 0,36$	1,073 n.s.	7	$1,17 \pm 0,31$	1,847 n.s.
17	$0,92 \pm 0,31$	Klappenfehler	7	$0,79 \pm 0,53$	-0,756 n.s.	7	$1,03 \pm 0,68$	0,553 n.s.
13	$0,90 \pm 0,31$	Coronartrose	10	$0,92 \pm 0,38$	0,139 n.s.	10	$1,03 \pm 0,40$	0,880 n.s.

Tabelle 19: Die Serum- β -Glucuronidaseaktivität bei verschiedenen Herzerkrankungen unterteilt nach Enzymaktivitäten bei Aufnahme in die Klinik und nach Enzymaktivitäten mit einer maximalen Abweichung während der Behandlung in der Klinik. Die aufgeführten Erkrankungen drücken sich nicht in einer statistisch signifikanten Aktivitätssteigerung der Serum- β -Glucuronidase gegenüber den Vergleichsgruppen Gesunder aus.

3.3. Urin- β -Glucuronidase

3.3.1. Kontrollwert

Der Durchschnittswert betrug bei den Kontrollpersonen $0,23 E$, $\pm 0,20 E$. Eine Korrelation zur Serum- β -Glucuronidase bestand nicht ($r = -0,186$ bei 82 Personen).

3.3.2. Pathologische Befunde bei Diabetes mellitus

Nephropathien treten bei Diabetes mellitus gehäuft auf. Geschädigte Nierenareale als Herkunft der Urin- β -Glucuronidase kamen in Betracht. Trotzdem unterschied sich der Mittelwert bei den Diabetikern mit $\bar{x} = 0,27 \pm 0,16 E$ nicht statistisch gesichert gegenüber der Kontrollgruppe ($t = 1,181$; $FG = 128$ (n.s.)).

3.4. Speichel- β -Glucuronidase

3.4.1. Kontrollwert

Der Kontrollwert betrug $\bar{x} = 0,43 E$ mit einer Standardabweichung $s = \pm 0,47 E$. Korrelationen mit Alter, Geschlecht, Östrogenapplikation, den Laborwerten von Triglyceriden, Cholesterin, sowie den Serum-Enzymen CK, SGOT, SGPT, GLDH, β -Glucuronidase, dem Quickwert und mit dem Gesamtbilirubin bestanden nicht (Tabelle 20).

Anzahl der Kontrollpersonen	Korrelation der Speichel- β -Glucuronidase mit	Korrelationskoeffizient
n		r
93	Alter	-0,020
93	Geschlecht	0,038
92	Östrogenapplikation	0,110
68	Triglyceride	-0,019
72	Cholesterin	-0,001
90	CK	0,011
91	SGOT	-0,043
91	SGPT	0,116
91	GLDH	-0,062
52	Gesamt-Bilirubin	-0,022
92	Quick	0,097
90	systolischer Blutdruck	-0,072
90	diastolischer Blutdruck	-0,055

Tabelle 20: Zusammenstellung der Korrelationskoeffizienten, die die Speichel- β -Glucuronidase der Kontrollgruppe betreffen.

3.4.2. Pathologische Befunde

In Tabelle 21 wurden die Ergebnisse der Speichel- β -Glucuronidase zusammengestellt; statistisch signifikant erhöht war die Speichel- β -Glucuronidase bei akuter Hepatitis (Maximalwert), während die Enzymaktivität statistisch auffällig bei akuter Hepatitis (Aufnahmewert), bei chronischer Hepatitis (Maximalwert), Leberzirrhose (Maximalwert) und bei Herzinfarkt (Maximalwert) vermehrt war.

Kontrollpersonen		Diagnose	Patienten der Herz- und der Leberstation					
			Aufnahmewert			Enzymaktivitätspiegel		
Anzahl	Speichel- β -Glucuronidaseaktivität		Anzahl	Speichel- β -Glucuronidaseaktivität	Statistische Auswertung	Anzahl	Speichel- β -Glucuronidaseaktivität	Statistische Auswertung
n	$\bar{x} \pm s \pm E$		n	$\bar{x} \pm s \pm E$	t p	n	$\bar{x} \pm s \pm E$	t p
18	0,25 $\pm$ 0,17	akute Hepatitis	15	1,29 $\pm$ 1,67	2,634 <0,05 *	6	2,30 $\pm$ 2,00	4,506 <0,01 **
14	0,39 $\pm$ 0,42	chronische Hepatitis	4	1,05 $\pm$ 1,16	1,851 n.s.	5	1,98 $\pm$ 2,72	2,228 <0,05 *
13	0,27 $\pm$ 0,41	Zirrhose	7	0,42 $\pm$ 0,41	0,780 n.s.	7	1,29 $\pm$ 1,46	2,399 <0,05 *
6	0,30 $\pm$ 0,25	Herzinfarkt	9	2,08 $\pm$ 2,75	1,562 n.s.	8	2,94 $\pm$ 2,98	2,142 <0,05 *
7	0,53 $\pm$ 0,55	Herzinsuffizienz	7	1,06 $\pm$ 0,37	2,115 n.s.	7	2,25 $\pm$ 2,34	1,891 n.s.
10	0,41 $\pm$ 0,47	Klappenfehler	7	1,32 $\pm$ 2,44	1,164 n.s.	6	1,61 $\pm$ 2,57	1,475 n.s.
7	0,31 $\pm$ 0,49	Coronarstenose	8	1,98 $\pm$ 2,67	1,624 n.s.	7	2,37 $\pm$ 2,60	2,060 n.s.

Tabelle 21: Die Speichel- β -Glucuronidaseaktivität bei verschiedenen Erkrankungen nach Enzymaktivitäten bei Aufnahme in die Klinik und nach Enzymaktivitäten mit maximaler Abweichung während der Behandlung in der Klinik geordnet.

** statistisch signifikant gegenüber gesunden Kontrollgruppen

* statistisch auffällig gegenüber gesunden Kontrollgruppen

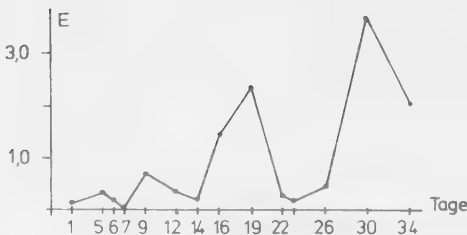
Die möglichen Aussagen dieser Ergebnisse wurden eingeschränkt von folgenden zwei Ergebnissen :

- 1) der innerhalb einer Stunde dreimal produzierte Speichel bei einer Patientin zeigte Schwankungen in der Enzymaktivität, die über 500% betrug (Tabelle 22),

min	Speichel- β -Glucuronidaseaktivität in E
0	7,90
30	1,53
60	2,39

Tabelle 22 : Speichel- β -Glucuronidase = aktivität von Speichelproben, die im Abstand von 30 Minuten produziert wurden.

- 2) im Verlaufe des stationären Aufenthaltes kam es zu maximalen Aktivitätssteigerungen, ohne daß bei den Patienten andere klinische Meßwerte pathologisch verändert ausfielen (Abbildung 15, Tabelle 23).



Tag des stationären Aufenthaltes	Speichel- β -Glucuronidaseaktivität in E
2	0,14
5	0,34
6	0,18
7	0,04
9	0,72
12	0,37
14	0,23
16	1,47
19	2,40
22	0,27
23	0,21
26	0,47
30	3,71
34	2,06

Abbildung 15, Tabelle 23 : Verlauf der Speichel- β -Glucuronidaseaktivität während des stationären Aufenthaltes. 58 Jahre alter Patient mit chronischer Hepatitis.

4. Diskussion

4.1. Methode zur Bestimmung der Serum- β -Glucuronidaseaktivität

Die hier mitgeteilten Ergebnisse stimmen weitgehend mit denen von Mead, Smith und Williams (55) überein: das pH-Optimum der Serum- β -Glucuronidase lag bei 3,5, wenn mit 0,1 M Acetatpuffer gearbeitet wurde. Hierbei entwickelte die Serum- β -Glucuronidase jedoch nur geringe Aktivität. Eine Steigerung der Enzymaktivität ließ sich erreichen, indem die Pufferkonzentration herabgesetzt wurde; dieses stieß auf zwei Probleme: erstens bedeutete eine erniedrigte Ionenstärke eine verminderte Pufferkapazität und zweitens verlagerte sich das pH-Optimum bei geringerer Ionenstärke in den saureren Bereich. Aus praktischen Erwägungen wurde der Puffer mit der Ionenstärke $J = 0,005$ zur Bestimmung der Serum- β -Glucuronidase ausgewählt, da Puffer niedrigerer Konzentration nach Zugabe der Serumprobe den pH nicht mehr halten konnten, der für optimale Bedingungen sorgte, obwohl bei den sehr niedrigen Pufferkonzentrationen eine höhere Enzymaktivität zu verzeichnen war.

Reaktionstemperatur und Substratkonzentration waren zwei Variable, die zunächst übernommen wurden, obwohl die Optimierung in diesen beiden Bereichen aller Wahrscheinlichkeit nach noch weiter vorwärtsgetrieben werden kann.

Die Michaeliskonstante betrug $K_m = 0,133$ mM und stimmte damit größenordnungsmäßig mit der von Woollen gefundenen überein: 0,28 - 0,35 mM (92), wenn man außerdem beachtete, daß der K_m -Wert der Serum- β -Glucuronidase eine schwanken- de Größe war, die bei Erkrankungen von der Norm abwich (24,92). Hellman (30) errechnete ein $K_m < 0,01$ mM. Es liegt nahe, diese unterschiedlichen K_m -Werte auf das Auftreten von Isoenzymen zurückzuführen. Fishman (24) beobachtete bei Zirrhotikern von der Norm abweichende Kinetik der Serum- β -Glucuronidase.

Wie Abbildung 5a und Tabelle 4a zeigen, wurde bei den Untersuchungen zur Bestimmung der β -Glucuronidaseaktivität nicht im Substratoptimum gearbeitet. Auch Woollen und Walker (92) arbeiteten mit einer Substratkonzentration, die in der Nähe der Michaeliskonstanten lag. Erst excessive Substratkonzentrationen über 1,1 mM führten zu einer Hemmung der Serum- β -Glucuronidase, eine Konzentration, die zehnfach höher lag als die verwendete. Mead, Smith und Williams (55) hielten eine Substratkonzentration von 0,1 - 0,2 mM für optimal; aus praktischen Gründen bestimmte Contractor et al. (7) und Hellman (31) die Serum- β -Glucuronidase mit 0,05 mM MUGA-Endkonzentration.

Ein Temperaturoptimum fanden Buddecke et al. (5), Contractor et al. (7), Nilius (59), Schon et al. (79) und Szasz (84) bei 50°C. Daß die β -Glucuronidase sehr beständig ist, zeigte sich einmal wieder in der hohen Hitzstabilität.

Die Aktivität des Enzyms kann nach Woollen et al. (92) bis mindestens zu 240 Stunden bei einer Inkubationstemperatur von 37°C nachgewiesen werden, wobei sogar bis zu diesem Zeitpunkt eine lineare Proportionalität des Substratumsatzes festgestellt werden konnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit können das nicht bestätigen: lineare Proportionalität war bis zu acht Stunden Inkubationszeit zu verzeichnen (s. auch Szasz (84)) und nach 120 Stunden Inkubation hatte die enzymatisch beschleunigte Hydrolyse aufgehört. Drei Gründe sprachen für die hochgradige Verdünnung des Serum im Ansatz: Erstens wurden störende Inhibitoreffekte der alpha- und beta-Globulin-Fraktion aufgehoben (14,92), zweitens konnte eine Hyperbilirubinämie in dieser Verdünnung die Fluoreszenz nicht mindern, und drittens veränderte die Pufferkapazität des Serums unter diesen Bedingungen praktisch nicht den pH des Ansatzes.

Ein Nachteil der Methode war die irreversible Fluoreszenzlöschung des enzymatisch freigesetzten 4-Methyl-umbelliferon, doch konnte der Fehler gering gehalten werden, wenn zügig am Photometer gearbeitet wurde, und wenn die alkalisierten Proben vor Licht geschützt wurden.

Insgesamt betrachtet, dürften die wenigen Arbeitsgänge und die kurze Inkubationszeit den erwähnten Nachteil aufheben, sodaß mit der nach Mead, Smith und Williams modifizierten Methode ein rasches Verfahren zur Bestimmung der β -Glucuronidase in die Hand gegeben ist.

4.2. Serum- β -Glucuronidase

4.2.1. Kontrollwert

Die von Dubach et al. (15), Leipold et al. (48), Platt (65), Schön et al. (79), Szasz (84) und Utermann et al. (86) festgestellten Unterschiede der Serum- β -Glucuronidaseaktivität in Abhängigkeit vom Geschlecht konnten hier nicht festgestellt werden. Die Resultate stimmten mit der Aussage von Utermann et al. (86) überein, daß die Serum- β -Glucuronidaseaktivität vom Alter nicht wesentlich beeinflusst wird.

Der von Dohrmann (10) erwähnte Einfluß der Östrogene auf die Serum- β -Glucuronidase schien bekräftigt. Die in den Antikonzeptiva enthaltene Menge an weiblichen Sexualhormonen reichte jedoch nicht aus, die Unterschiede statistisch abzusichern ($t = 0,927$; $FG = 39$; $p = 0,4$; nicht signifikant).

GLDH und β -Glucuronidase sind subzellulär in verschiedenen Partikeln zu finden : in der Leber ist die GLDH mitochondrial, die β -Glucuronidase vorwiegend lysosomal lokalisiert. Dennoch war eine statistisch auffällige Korrelation beider Enzyme im Serum zu finden. Ein weiteres Indiz, daß zu mitochondrialen eine engere Verknüpfung als zu cytoplasmatischen Enzymen besteht, mag in der - wenn auch nicht statistisch signifikanten - engeren Korrelation der Serum- β -Glucuronidase zur SGOT als zur SGPT zu suchen gewesen sein.

Der Zusammenhang der Serum- β -Glucuronidase mit dem systolischen Blutdruck ließ sich nicht erklären. Eine Ursache in arteriosklerotisch veränderten Gefäßwänden zu suchen blieb problematisch, solange der Übertritt aus dem Gefäßwandgewebe ins Blut unbekannt war. Utermann et al. (86) konnten nämlich von erhöhter β -Glucuronidaseaktivität im arteriosklerotisch veränderten Gewebe berichten, ohne daß die Serum- β -Glucuronidase vermehrt aktiv war.

4.2.2. Pathologische Befunde

4.2.2.1. Diabetes mellitus

Es ist mehrfach die Serum- β -Glucuronidase bei Diabetes mellitus beschrieben worden. Jimenez et al. (35) testeten die Enzymaktivität bei Gesunden, Praediabetikern und Diabetikern und konnten einen signifikanten Unterschied zwischen Diabetikern und Gesunden feststellen. Einschränkung warteten Berger (3), Hagenfeld et al. (28) und Woollen et al. (90) mit ähnlichen Ergebnissen auf: die Serum- β -Glucuronidase zeigte bei Diabetes mellitus Geschlechtsabhängigkeit. Bei Frauen wurden höhere Werte gefunden als bei Männern; Woollen (90) konstatierte sogar nur bei den Frauen eine Aktivitätssteigerung.

Auffallend war die mit Dauer der Erkrankung abnehmende Serum- β -Glucuronidaseaktivität. Die Tatsache, daß die Serum- β -Glucuronidase bei Aufdeckung der Erkrankung am höchsten war, läßt eine weitere Austestung dieses Serumenzym als Diagnostikums sinnvoll erscheinen.

4.2.2.2. Lebererkrankungen

Von zahlreichen Autoren sind die Serum- β -Glucuronidase in Zusammenhang mit verschiedenen Lebererkrankungen untersucht worden. Nach Dohrmann (10), Leipold et al. (48), Nilius (60), Schön et al. (79) und Woollen et al. (90) konnten bei akuter Hepatitis, chronischer Hepatitis und Leberzirrhose in wechselndem Ausmaß gesteigerte Serum- β -Glucuronidaseaktivität auftauchen. Eine differentialdiagnostische Bedeutung wurde jedoch dem Enzym abgesprochen. Das Ergebnis der Varianzanalyse fügte sich in diese Überlegungen ein.

Die in der Tabelle 16 ersichtlichen, hohen Standardabweichungen machen deutlich, daß nicht bei jedem Patienten eine pathologisch veränderte Serum- β -Glucuronidase auftrat. Bei Aufnahme waren unter 16 Patienten mit akuter Hepatitis drei mit unauffälliger Serum- β -Glucuronidase, unter 8 Patienten mit chronischer Hepatitis 3 Erkrankte mit normaler Enzymaktivität, und bei 6 Zirrhotikern gab es zwei, die keine erhöhte Serum- β -Glucuronidaseaktivität zeigten. Schön et al. (79) konnten ähnliche Ergebnisse beschreiben: unter 26 akuten Hepatitiden war die Serum- β -Glucuronidase zweimal normal, unter 10 chronischen Hepatitiden und unter 9 Zirrhotikern waren es je 5 Patienten mit unauffälliger Enzymaktivität.

Bei allen akuten Hepatitiden lagen die Transaminasen in erhöhten Bereichen, so daß im Vergleich zur Serum- β -Glucuronidase hinsichtlich diagnostischer Treffsicherheit die Transaminasen überlegen waren.

Exemplarisch wird bei einem Patienten in Abbildung 13, Tabelle 17 gezeigt (s. auch Nilius (60)), daß die Serum- β -Glucuronidase im Zeitraum der stationären Behandlung einem Aktivitätsgipfel zustrebte, der im Vergleich zu dem der SGPT verspätet auftrat. Ebenfalls die Rückkehr zur Norm verzögerte sich: wenn die SGPT schon wieder unauffällige Werte erreicht hatte, war die Serum- β -Glucuronidase noch erhöht. Die verspätet auftretende Serum- β -Glucuronidaseaktivitätssteigerung bestärkte die Annahme, die β -Glucuronidase nicht nur als Hinweis für Zelldestruktion zu werten. Die erhöhte Enzymaktivität bei einem Patienten mit biliärer Leberzirrhose mochte verdeutlichen, daß die Serum- β -Glucuronidase als ein "Regenerationszeichen" zu sehen war: während einer gesteigerten "turn over"-Situation des Mucopolysaccharidstoffwechsels bei Leberzirrhose war die β -Glucuronidaseaktivität erhöht.

4.2.2.3. Herzerkrankungen

Es wäre denkbar, daß Herzinsuffizienz *sui generis* oder als Begleiterkrankung eine Aktivitätssteigerung der Serum- β -Glucuronidase infolge einer Stauungsleber hervorrufen würde. Die Ergebnisse bestätigen diese Erwartung jedoch nicht. Auch Leipold et al. (48) und Nilius (60) entdeckten keine Veränderung der Serum- β -Glucuronidase bei Herzinsuffizienz.

Über Herzinfarkt und Serum- β -Glucuronidase gibt es in der Literatur unterschiedliche Aussagen; Woollen (91,92) konnte bei Herzinfarkt eine besonders bei Frauen erhöhte und lang anhaltende Aktivitätssteigerung der Serum- β -Glucuronidase erkennen (bis zu sechs Monaten). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen Leipolds et al. (48) Beobachtungen, wonach zumindest im Zeitraum von sechs Wochen die Serum- β -Glucuronidase bei Herzinfarkt nicht erhöht ist.

4.3. Urin- β -Glucuronidase

4.3.1. Kontrollwert

Wurden die Kontrollwerte der Serumproben mit den der Urinproben korreliert, so fiel ein negativer, statistisch nicht signifikanter Korrelationskoeffizient auf. Somit schien eine mögliche Herkunft der Urin- β -Glucuronidase durch passive Filtration aus dem Blut entkräftet. Das Molekulargewicht des Enzyms ist zu hoch, als daß die Serum- β -Glucuronidase nach Passieren der Glomerula im Urin erscheinen könnte. Da Coli- β -Glucuronidase und Urin- β -Glucuronidase weit auseinanderklaffende pH-Optima aufweisen, entfiel ein bakterieller Ursprung ebenfalls. Als möglicher Ursprung kam die Tubuluszelle und die Epithelien der Harnwege in Betracht; der Übertritt in den Urin blieb ungeklärt, soweit physiologische Verhältnisse vorliegen.

4.3.2. Pathologische Befunde bei Diabetes mellitus

Die Urin- β -Glucuronidase war zur Diagnose bzw. Prognose des Diabetes mellitus ungeeignet.

4.4. Speichel- β -Glucuronidase

4.4.1. Kontrollwert

Wenn auch der Kontrollwert eine sehr breite Streuung zeigte (über 100%), so hob er sich gegenüber pathologisch erhöhten Werten ab.

4.4.2. Pathologisches Auftreten

Die gefundenen statistisch signifikanten Unterschiede bei einigen Erkrankungen gegenüber der Kontrolle mußten in ihrer Aussage abgeschwächt werden. Unerklärbare, sehr hohe Schwankungen innerhalb kurzer Zeit und im Verlaufe des stationären Aufenthaltes, ohne daß durch andere Meßwerte eine Erklärung dafür gegeben werden konnte, stellen den Wert der Speichel- β -Glucuronidase im Rahmen der hier mitgeteilten Untersuchungen in Frage.

5. Zusammenfassung

Aktivitätsmessung der β -Glucuronidase

Die Bestimmung der β -Glucuronidaseaktivität mittels MUGA (4-Methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronid) erwies sich als eine praktikable Methode, die durch wenige Arbeitsgänge und einen geringen Zeitaufwand gekennzeichnet war.

Serum- β -Glucuronidase

1. Diabetiker wiesen gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Enzymaktivitätssteigerung auf, die mit zunehmender Dauer der Erkrankung abnahm.
2. Akute und chronische Hepatitis zeigten im Verlauf des stationären Aufenthaltes eine signifikante Aktivitätserhöhung der Serum- β -Glucuronidase.
3. Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, Coronarstenose und Klappenfehler des linken Herzen waren hinsichtlich der Serum- β -Glucuronidase unauffällig.

Urin- β -Glucuronidase

Bei Diabetes mellitus war die Urin- β -Glucuronidase ohne diagnostische Aussage.

Speichel- β -Glucuronidase

Trotz statistisch signifikanter Abweichungen von der gesunden Gruppe bei einigen Erkrankungen blieb der diagnostische Wert der Speichel- β -Glucuronidase wegen hoher Aktivitätsschwankungen innerhalb kurzer Zeit zweifelhaft.

6. Literatur

- (1) Bach, G., Cantz, M., Hall, C.W., Neufeld, E.F.
Genetic Errors of Mucopolysaccharide Degradation
Biochem. Soc. Transactions 1, 231-234, 1973
- (2) Begum, A., Ittyera, T.R.
Arylsulfatase and β -Glucuronidase Activity in Serum in Kwashiorkor
Clin. Chim. Acta 28, 263-268, 1970
- (3) Berger, W.
 β -Glucuronidase, Diabetes mellitus und Arteriosklerose
Schweiz. Med. Wschr. 97, 1553-1554, 1967
- (4) Branwood, A.W., Carr, A.J.
 β -Glucuronidase Activity of Coronary Atherosclerotic Plaques
Lancet 1960/II, 1254-1255
- (5) Buddecke, E., Hoefele, O.
Untersuchungen zur Chemie der Arterienwand
Reinigung und Eigenschaften der β -Glucuronidase aus der Aorta des Rindes
Z. Physiol. Chem. 347, 173-191, 1966
- (6) Cho-Chung, Y.S., Lanzerotti, R.H., Gullino, P.N.
Mammary Tumor Regression and New Synthesis of Lysosomal Enzymes
Fed. Proc. 30, 1168, 1971
- (7) Contractor, S.F., Shane, B.
Purification and Characterisation of Lysosomal β -Glucuronidase from Human Placenta
Biochem. J. 128, 11-18, 1972
- (8) Deshmukh, K., Nimni, M.E.
Effects of Lysosomal Enzymes on the Type of Collagen Synthesized by Bovine Articular Cartilage
Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 424-431, 1973
- (9) Dohrmann, R.E.
Glucuronidierung - Teilfunktion des Entgiftungsstoffwechsel
Med. Klin. 62, 539-542, 1967

- (10) Dohrmann, R.E.
β-Glucuronidase
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1969
- (11) Dohrmann, R.E., Klesper, R.
Untersuchungen zur β-Glucuronidaseaktivität menschlicher Thrombocyten
Klin. Wschr. 38, 595-598, 1960
- (12) Dohrmann, R.E., Köhler, M.
Die β-Glucuronidaseaktivität im Serum, Leber- und Nierengewebe beim
Alloxan-Diabetes
Diabetologica, 2, 195-197, 1966
- (13) Dohrmann, R.E., Köhler, M., Uhles, H.J.
Untersuchungen über die akute Glucagonwirkung auf Glycogen und die β-
Glucuronidaseaktivität von Leber, Milz und Nieren
Z. ges. exp. Med. 140, 178-188, 1966
- (14) Dohrmann, R.E., Uhles, H.J.
Untersuchungen über die Hemmwirkung des menschlichen Serums auf das
Ferment β-Glucuronidase
Klin. Wschr. 41, 527-531, 1963
- (15) Dubach, U.C., Jösch-Locher, M.
Serum-β-Glucuronidase-Aktivität in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter
bei Diabetes mellitus
Clin. Chim. Acta 21, 453-460, 1968
- (16) de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Applemans, R.
Tissue Fractionation Studies
6. Intracellular Distribution Patterns of Enzymes in Rat-Liver Tissue
Biochem. J. 60, 604-617, 1955
- (17) Eberhard, A., Laas, U., Vojtisek, O., Greiling, H.
Zur Bedeutung und Herkunft von lysosomalen Enzymen in der Synovial-
flüssigkeit bei chronischen Gelenkerkrankungen
Z. Rheumaforsch. 31, 105-118, 1972

- (18) Fishman, W.H.

Studies on β -Glucuronidase

III. The Increase in β -Glucuronidase Activity of Mammalian Tissue Induced by Feeding Glucuronidogenic Substances

J. Biol. Chem. 136, 229-236, 1940

- (19) Fishman, W.H.

β -Glucuronidase: Its Relation to the Action of the Estrogenic Hormones

J. Biol. Chem. 169, 7-15, 1947

- (20) Fishman, W.H., Anlyan, A.J.

The Presence of High β -Glucuronidase Activity in Cancer Tissue

J. Biol. Chem. 169, 449-450, 1947

- (21) Fishman, W.H., Benjamin, G.S., Green, S.

A Biochemical Effect of Gonadotropin (ICSH): Renal β -Glucuronidase Stimulation

J. Biol. Chem., 222, 351-361, 1956

- (22) Fishman, W.H., Fishman, L.W.

The Evaluation of Uterine β -Glucuronidase Activity by Estrogenic Hormones

J. Biol. Chem., 152, 487-488, 1944

- (23) Fishman, W.H., Green, S.

Enzymic Catalysis of Glucurnyl Transfer

J. Biol. Chem. 225, 435-452, 1957

- (24) Fishman, W.H., Kato, K., Anstiss, C.L., Green, S.

Human Serum- β -Glucuronidase; Its Measurement and Some of its Properties

Clin. Chim. Acta 15, 435-447, 1967

- (25) Fishman, W.H., Lipkind, J.B.

Comparative Ability of Some Steroids and their Esters to Enhance the Renal β -Glucuronidase Activity of Mice

J. Biol. Chem. 232, 729-736, 1958

- (26) Fishman, W.H., Springer, B., Brunetti, R.

Application of an Improved Assay Method to the Studies of Human β -Glucuronidase

J. Biol. Chem. 173, 449-456, 1948

- (27) Greenbaum, A.L., Slater, T.F., Wang, D.Y.
Lysosomal Enzyme Changes in Enforced Mammary-Gland Involution
Biochem. J. 97, 518-522, 1965
- (28) Hagenfeld, L., Wahlberg, F.
Serum β -Glucuronidase, Glucose Tolerance, and Atherosclerotic Disease
Lancet 1965/i, 788-789
- (29) Held, E., Hoefele, O., Reich, G., Stein, U., Werries, E., Buddecke, E.
Wirkungssynergismus Chondroitin-4-sulfat-Protein abbauender Enzyme des
Arterien Gewebes
Z. Klin. Chem. 6, 244-250, 1968
- (30) Hellman, B.
Fluorometric Assays of Different β -Glucuronidases in Microdissected Pancreatic
Islets from Obese-Hyperglycemic Mice
Metabolis 16, 1051-1058, 1967
- (31) Hellman, B.
Some Metabolic Aspects of the Obese-Hyperglycemic Syndrome in Mice
Diabetologica 3, 222-229, 1967
- (32) Helmien, H.J., Ericson, J.L.E.
Effects of Enforced Milk Stasis on Mammary Gland Epithelium, with Special
Reference to Changes in Lysosomes and Lysosomal Enzymes
Exp. Cell Res. 68, 411-427, 1971
- (33) Hickman, S., Neufeld, E.F.
A Hypothesis for I-Cell Disease: Defective Hydrolases do not Enter Lysosomes
Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 992-999, 1972
- (34) van Hoof, F., Hers, H.G.
The Abnormalities of Lysosomal Enzymes in Mucopolysaccharidosis
Eur. J. Biochem. 7, 34-44, 1968
- (35) Jimenez, J.A., Camerini-Davalos, R.A.
Abnormal β -Glucuronidase Activity in Asymptomatic Diabetes
J. Diabetes 16, 527-528, 1967
- (36) Karunairatnam, M.C., Kerr, L.M.H., Levy, G.A.
Glucuronide Synthesis and Cell Proliferation
Biochem. J. 44, XXX, 1948

- (37) Karunairatnam, M.C., Levvy, G.A.
The Inhibition of β -Glucuronidase by Saccharic Acid and Role of the Enzyme in Glucuronide Synthesis
Biochem. J. 44, 599-604, 1949
- (38) Karunairatnam, M.C., Levvy, G.A.
 β -Glucuronidase and Glucuronide Synthesis
Biochem. J. 43, LII, 1948
- (39) Kayahan, S.
Atherosclerosis and β -Glucuronidase
Lancet 1960/II, 667-669
- (40) Kerr, L.M.H., Levvy, G.A.
 β -Glucuronidase as an Index of Growth in the Uterus and Other Organs
Biochem. J. 43, LIII, 1948
- (41) Kerr, L. M.H., Campbell, J.G., Levvy, G.A.
 β -Glucuronidase as an Index of Growth in the Uterus and Other Organs
Biochem. J. 44, 487-498, 1949
- (42) Kerr, L.M.H., Campbell, J.G., Levvy, G.A.
Further Observations on Changes in β -Glucuronidase Activity in the Mouse
Biochem. J. 46, 278-284, 1950
- (43) Koller, S.
Neue graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen
Dr. Dietrich Steinkopf Verlag
Darmstadt 1969
- (44) Kramer, H.J., Gonick, H.C.
Saure Phosphatase und β -Glucuronidase-Aktivitäten im Harn bei Nieren-
erkrankungen und nach Nierentransplantationen
Verh. dtsh. ges. inn. Med. 77, 707-710, 1971
- (45) Kresse, H., Buddecke, E.
Veränderungen in der Aktivität Chondroitinsulfat-Protein abbauender Enzyme (Glycosaminoglycanhydrolasen und Peptidhydrolasen) des Arterien-
gewebes im Alter und bei Arteriosklerose
Z. klin. Chem. 6, 251-256, 1968

- (46) Kröner, H., Staib, W.
Leberenzyme bei akuter Tetrachlorkohlenstoffvergiftung
Z. klin. Chem. 6, 318-321, 1968
- (47) Lanzerotti, R.H., Gullino, P.M.
Activities and Quantities of Lysosomal Enzymes during Mammary Tumor Regression
Cancer Res. 32, 2679-2685, 1973
- (48) Leipold, H., Wüst, H., Schön, H.
Bedeutung und Grenzen der quantitativen Fermentdiagnostik im Serum
Dtsch. Med. Wschr. 86, 1341-1349, 1961
- (49) Levvy, G.A.
 β -Glucuronidase. In: Dutton, G.J., Glucuronic Acid,
S. 350-355 New York and London
Academic Press 1966
- (50) Levvy, G.A.
The Preparation and Properties of β -Glucuronidase
4. Inhibition by Sugar Acids and their Lactones
Biochem. J. 52, 464-471, 1952
- (51) Levvy, G.A., Marsh, C.A.
The Preparation and Properties of β -Glucuronidase
Biochem. J. 52, 690-694, 1952
- (52) Lightbody, J., Wiesmann, U., Hadorn, B., Herschkowitz, N.
I-Cell Disease: Multiple Lysosomal Enzyme Defect
Lancet 1971/I, 451
- (53) Löffler, H., Platt, D., Platt, M.
Cytochemischer Nachweis von β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase
bei Plasmocytom
Klin. Wschr. 48, 480-482, 1970
- (54) Mattenheimer, H.
Enzymbestimmungen im Urin als diagnostisches Hilfsmittel
Dtsch. Med. Wschr. 92, 2075-2076, 1967

- (55) Mead, J.A.R., Smith, J.N., Williams, R.T.
Studies in Detoxication 67. The Biosynthesis of the Glucuronides of
Umbelliferone and 4-Methylumbelliferone and their Use in Fluorimetric
Determination of β -Glucuronidase
Biochem. J. 61, 569-574, 1955
- (56) Mills, G.T., Paul, J., Smith, E.E.B.
Studies on β -Glucuronidase
2. The Preparation and Properties of three Ox Spleen β -Glucuronidase
Fractions
Biochem. J. 53, 232-245, 1953
- (57) Mills, G.T., Paul, J., Smith, E.E.B.
Studies on β -Glucuronidase
3. The Influence of Age, Partial Hepatectomy and Other Factors on the
 β -Glucuronidase Activity of Rat Liver
Biochem. J. 53, 245-253, 1953
- (58) Neuberg, C., Neimann, W.
Synthese gepaarter Glucuronsäuren
Z. Physiol. Chem. 44, 114-126, 1905
- (59) Nilius, R.
Zur Bestimmung der β -Glucuronidase im Serum
Z. klin. Chem. 4, 257-262, 1966
- (60) Nilius, R.
Die Serum- β -Glucuronidase bei Lebererkrankungen
Med. Klin 62, 1082-1086, 1967
- (61) Nilius, R., Rath, F.W.
 β -Glucuronidase bei chronischer Tetrachlorkohlenstoffvergiftung der Ratten-
leber
Z. ges. exp. Med. 146, 366-382, 1968
- (62) Nilius, R., Rath, F.W. unter Mitarbeit von A. Gomez
 β -Glucuronidase bei akuter Tetrachlorkohlenstoffschädigung der Rattenleber
Z. ges. exp. Med. 144, 157-172, 1972

- (63) Ockerman, P.A., Kohlin, P.
Acid Hydrolysis in Plasma in Gaucher's Disease
Clin. Chemistry 15, 61-63, 1969
- (64) Platt, D.
Hyaluronidase, β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase Aktivität in normalen und arteriosklerotisch veränderten menschlichen Aorten
Klin. Wschr. 45, 92-95, 1967
- (65) Platt, D.
Altersabhängige Aktivitätsänderungen lysosomaler Enzyme in Serum und Organen der Menschen
Dtsch.Med.Wschr. 95, 634-637, 1970
- (66) Platt, D., Koch,
Erhöhung der Hyaluronidase, β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase-Aktivität im Serum bei Mucopolysaacharidosen
Klin.Wschr. 47, 888-889, 1969
- (67) Platt, D., Leinweber, B.
Untersuchungen zum katabolen Mucopolysaccharidstoffwechsel bei Lebererkrankungen
Acta hepatosplenologica 16, 324-330, 1969
- (68) Platt, D., Platt, M.
Hyaluronidase, β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase-Aktivität im menschlichen Serum während der Schwangerschaft
Klin. Wschr. 46, 768-771, 1968
- (69) Platt, D., Platt, M.
Glycogenose Typ II (Pompesche Krankheit) mit alpha-Amylase und Hyaluronidase-Mangel
Dtsch.Med.Wschr. 94, 1414-1416, 1969
- (70) Platt, D., Platt, M.
Biochemischer und histochemischer Nachweis der β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase in normalen und pathologisch veränderten menschlichen Lymphozyten
Blut 22, 12-18, 1971

- (71) Platt, D., Platt, M., Schütterle, G.
Histochemischer Nachweis lysosomaler Enzyme (β -Glucuronidase und β -Acetyl-Glucosaminidase) in normalen menschlichen Nieren
Klin.Wschr. 48, 501-502, 1970
- (72) Platt, D., Schnorr, B.
Biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an normalen und arteriosklerotisch veränderten menschlichen Aorten
Klin.Wschr. 47, 991-999, 1969
- (73) Platt, D., Stein, U.
Untersuchungen zum katabolen Mucopolysaccharid-Protein-Stoffwechsel in menschlichen Organen
Z. Klin. Chem., 7, 374-378, 1969
- (74) Platt, D., Stein, U., Heissmeyer, H.
Untersuchungen zum katabolen Mucopolysaccharid-Proteinstoffwechsel der Rattenleber nach Gabe von Äthanol
Z.Klin.Chem. 9, 126-129, 1971
- (75) Raab, W.
Die diagnostische Bedeutung der Bestimmung von Herzenzymaktivitäten
Z.Klin.Chem 9, 143-154, 1971
- (76) Ravens, K.G., Gudbjarnason, S.
Changes in the Activities of Lysosomal Enzymes in Infarcted Canine Heart Muscle
Circul. Res. 24, 851-856, 1969
- (77) Richterich, R., Dauwalder, H.
Die Bestimmung der β -Glucuronidase im Serum und Urin
Z.Klin.Chem., 4, 105-107, 1966
- (78) Romeo, D., de Bernard, B.
Purification and Properties of Beef Heart β -Glucuronidase
Biochim. Biophys. Acta 159, 194-197, 1968

- (79) Schön, H., Leipold, H.
Bestimmung der β -Glucuronidase-Aktivität im menschlichen Serum
Klin.Wschr. 40, 292-294, 1962
- (80) Shamberger, R.J.
Lysosomal Enzyme Changes in Growing and Regressing Mammary Tumors
Biochem. J. 111, 375-383, 1969
- (81) Simon, L., Figus, A.J.
Die diagnostische Bedeutung der β -Glucuronidase-Aktivität im Mangesaft
Schweiz.med.Wschr. 101, 499-501, 1971
- (82) Stanescu, V., Bona, C., Ionescu, V.
Histochemical and Histo-Enzymological Investigations of Growing Cartilage
in Pseudo-Hypoparathyroidism
Acta Endocrinologica 60, 433-445, 1969
- (83) Stolk, A.
Histochemical Localisation of β -Glucuronidase in Healing Wounds of the
Iguana
Lancet 1961/I 1411
- (84) Szasz, G.
Die Bestimmung der β -Glucuronidase Aktivität im Serum mit p-Nitrophenyl-
glucuronid
Clin.Chim. Acta 15, 275-282, 1967
- (85) Talalay, P., Fishman, W.H., Huggins, C.
Chromogenic Substrates
II. Phenolphthalein Glucuronic Acid as Substrate for the Assay of Glucuronidase
Activity
J. Biol.Chem. 166, 757-772, 1946
- (86) Utermann, D., Lorenzen, F., Hilz, H.
Die Bestimmung der β -Glucuronidase und Nitrocatecholsulfatase im Serum
gesunder und arteriosklerotischer Personen
Klin.Wschr. 42, 352-357, 1964

- (87) Varma, T.N.R., Brodie, H.J., Kwass, G., Hayano, M., Dorfman, R.J.
Increase of β -Glucuronidase Activity on Incubation of Normal and Testosterone-stimulated Mice Kidney Preparations
Acta endocrinologica 45, 40-46, 1964
- (88) Weber, H., Wegmann, T.
Der Nachweis von Pancreopathien durch Bestimmung der Serumlipase mit Hilfe einer neuen Mikromethode
Dtsch. Med. Wschr. 90, 1203-1209, 1965
- (89) Woessner, J.F. junior
Acid Hydrolases of the Rat Uterus in Relation to Pregnancy, Post-partum Involution and Collagen Breakdown
Biochem. J. 97, 855-866, 1965
- (90) Woollen, J.W., Turner, P.
Plasma N-Acetyl- β -Glucosaminidase and β -Glucuronidase in Health and Disease
Clin. Chim. Acta 12, 671-683, 1965
- (91) Woollen, J.W., Turner, P.
Serum- β -Glucuronidase, Glucose Tolerance, and Atherosclerotic Disease
Lancet 1965/I, 1071-1072
- (92) Woollen, J.W., Walker, P.G.
The Fluorimetric Estimation of β -Glucuronidase in Blood Plasma
Clin. Chim. Acta 12, 659-670 (1965)
- (93) Yam, L.T., Mitus, W.J.
The Lymphocyte β -Glucuronidase Activity in Lymphoproliferative Disorders
Blood 31, 480-489, 1968

Herrn Prof. Dr. med. Carl-Heinz Hammar, der die vorliegende Arbeit angeregt und mit wohlwollendem Interesse in guter Zusammenarbeit und fördernder Kritik begleitet hat, bin ich sehr dankbar verpflichtet.

Frau Dr. med. et Dr. phil P. Netter möchte ich für die Beratung bei der statistischen Ausarbeitung sehr herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. W. Prellwitz für die Bereitstellung der Laborgeräte und die Überlassung von Patientenserien und -harnproben.

Herr Prof. Dr. med. G.J. Kremer stellte mir die Krankenblätter der Diabetiker zur Verfügung; für die Unterstützung bin ich ihm dankbar.

Lebenslauf

Als Sohn des Reichsbahnrat Dipl.-Ing. Karl-Ludwig Rohde und seiner Ehefrau Vera Edelgard, geb. Masing, wurde ich am 9. November 1943 in Göttingen geboren. Ostern 1950 wurde ich in Göttingen eingeschult und legte im März 1964 die Reifeprüfung am Gymnasium Kreuzgasse in Köln ab. April 1964 bis März 1966 leistete ich den Wehrdienst bei der Bundeswehr ab. Im Sommersemester 1966 immatrikulierte ich mich an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz, wo ich das Medizinstudium im Juni 1972 mit dem Staatsexamen abschloß. Am 8. September 1972 heiratete ich meine Frau Anna-Maria, geb. Treiling. Am Kreiskrankenhaus Tuttlingen verbrachte ich meine Medizinalassistentenzeit bis September 1973 und erhielt im November 1973 die Approbation als Arzt. Seit Oktober 1973 bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Physiologisch Chemischen Institut der Johannes Gutenberg-Universität tätig. Am 9. September 1974 wurde unser Sohn Ulrich geboren.

